

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Rôle des microdomaines membranaires riches en cholestérol dans les fibroblastes jeunes et sénescents

Warnon, Céline

*Award date:*  
2015

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**UNIVERSITE DE NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Rôle des microdomaines membranaires riches en cholestérol dans les  
fibroblastes jeunes et sénescents**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Céline WARNON

Janvier 2015



**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Rôle des microdomaines membranaires riches en cholestérol dans les fibroblastes jeunes et sénescents**

WARNON Céline

### Résumé

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides qui semblent être impliqués dans des fonctions biologiques telles que l'entrée des pathogènes, la signalisation des lymphocytes T ou encore les voies de signalisations cellulaires. Le rôle des radeaux lipidiques dans la signalisation cellulaire a largement été étudié en déplaçant son contenu en cholestérol dans les kératinocytes. La signalisation cellulaire dépendante des radeaux lipidiques est cependant moins connue dans d'autres types cellulaires. De plus, peu d'information sont disponibles quant à l'évolution de cette signalisation avec la sénescence cellulaire. Le but de ce mémoire est d'étudier comment une déplétion en cholestérol affecte la signalisation cellulaire dans des fibroblastes humains de derme et comment cette signalisation évolue au cours de la sénescence répllicative. Dans cette optique, nous avons d'abord étudié l'expression de l'EGF-R au cours de la sénescence répllicative ainsi que l'effet d'une stimulation avec de l'EGF dans des fibroblastes jeunes et sénescents. Nous avons ensuite étudié l'effet d'une perturbation des radeaux lipidiques, par l'utilisation de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), un agent déplaçant le cholestérol, sur la signalisation dépendante de l'EGF-R. Les résultats montrent qu'après une déplétion en cholestérol, p38<sup>MAPK</sup> est active chez les fibroblastes et cette activation semble être indépendante de la voie de signalisation dépendante de l'EGF-R, et ce chez les fibroblastes jeunes et sénescents. Ces résultats semblent indiquer que d'autres voies de signalisation pourraient être impliquées en réponse à une déplétion en cholestérol chez les fibroblastes.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

**Promoteur:** F. Debacq-Chainiaux

**Co-Promoteur :** Y. Poumay

## REMERCIEMENTS

C'est avec émotion que j'écris ces quelques lignes en guise de ma gratitude envers les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, je tiens à remercier Martine Raes et tous les autres « seniors » pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire ces dix derniers mois.

Je tiens à remercier particulièrement Florence, ma promotrice, de m'avoir accordé sa confiance tout au long du mémoire. Sa bonne humeur et sa gentillesse ont fait de ce travail un véritable plaisir. Je la remercie également pour tous ses conseils et son suivi.

Je tiens également à remercier Marie, ma tutrice et « mon ange gardien » ( ;- ) ). Je pourrais résumer cette aventure avec ce proverbe « S'il n'est pas soutenu par un tuteur, le jeune arbre se courbe facilement ». Merci à toi de m'avoir appris les manips avec rigueur, patience et bonne humeur, et de m'avoir toujours bien conseillé.

Je remercie également les autres « GRAS » pour les conseils lors des réunions d'équipe, ainsi que les autres membres de l'URBC. Je remercie particulièrement Noëlle et Catherine pour les séances au confocal, Guy pour les fous rires, ainsi que tous les autres membres qui, un jour ou l'autre, nous ont forcément aidé en répondant à une simple question.

Je remercie également les membres du LabCeTi, particulièrement Yves Poumay pour ses conseils avisés lors des réunions ainsi qu'Abdallah et Evelyne pour m'avoir appris des nombreuses manips avec beaucoup de patience et de bonne humeur.

Je remercie également les autres mémorants, et particulièrement Aurélie et Dimitri (« Léon ») pour les nombreux moments de délire et de rigolades qui nous ont permis de déstresser et de passer une année vraiment super. Merci aux autres bio pour les sorties qui nous ont également permis de déstresser de temps en temps.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, pour avoir été présente tout au long de ce mémoire et de m'avoir soutenu dans les moments difficiles.

« Every story has an end, but in life every ending is just a new beginning »



## LISTE DES ABREVIATIONS

2OHp $\beta$ CD	2-hydroxyl- $\beta$ -cyclodextrine
Akt	thymoma viral proto-oncogene
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP-2	Activating Protein 2
ApoJ	Apolipoprotéine J
ARF	Alternate Reading Frame Protein
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia Telangectesia Mutated
$\beta$ -gal	Beta-galactosidase
t-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
BME	Basal Medium Eagle
BODIPY	Bore Dipyrométhène
BODIPY-SM	Bore Dipyrométhène Sphingomyéline
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Degré centigrade
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de Calcium
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CD44	Hyaluronate Receptor
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CDKI	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor
Cm <sup>2</sup>	Centrimètre carré
CO <sub>2</sub>	Dioxyde d'oxygène
CT	Cycle Threshold
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAG	Diacylglycérol
DDR	DNA Damage Response
DMSO	Diméthyl-sulfoxyde
DRM	Detergent Resistant Membrane
dT	Achored-oligo
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
ErbB	Erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogen homolog (avian)
Erk 1/2	Extracellular Regulated MAP Kinase 1/2
FCS	Fœtal Calf Serum
FGF(R)	Fibroblast Growth Factor (Receptor)
Fibro	Fibronectine
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GM1	Ganglioside monosyalidé 1
GPI	glycosil phosphatidyle inositol
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
GTPase	Guanosine-5'-triphosphatase
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAS2	Hyaluronan Synthase 2
HB-EGF	Heparin Binding-Epidermal Growth Factor
HDFs	Human Diploid Fibroblasts
HDM2	Human Double Minute 2 homolog
HER	Human EGF Receptor
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement

HMG-coA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A
HRP	horse radish peroxidase
IF	Immunofluorescence
Ig-lile	Immunoglobuline-like
IGFBP 3/5	Insuline-like Growth Factor Binding Protein 3/5
IGF-1(R)	Insulin Growth Factor Receptor
IL	Interleukine
JAK	Janus Kinase
LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M $\beta$ CD	methyl-beta-cyclodextrin
MEK 1/2	MAP kinase-ERK kinase 1/2
MKK	MAP kinase kinase
ml	millilitre
mM	Milimolaire
MMP	Matricial MetalloProteinase
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORc	mammalian Target of Rapamycin Complexe
NaCl	Chlorure de Sodium
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
Ng	Nanogramme
NHK	Normal Human Kerationcyte
NRG	Neuréguline
NS	Non significatif
Oséto	Ostéonectine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'Hydrogène
p16 <sup>INK-4A</sup>	Cyclin dependant kinase inhibitor 2a
p38 $\alpha$	MAPK14 ; Cytokinin Specific Binding Protein
p53	Cellular tumor antigen p53
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS-T	Phosphate Buffer Saline Tween-20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF(R)	Platelet Derived Growth Factor (Receptor)
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIB	Protease Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PI(4,5)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	phosphatidylinositol 1,4,5 tris phosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
pRB	Protéine du Retinoblastome
PTB	Phosphotyrosine Binding Domain
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	polyfluorure de vinylidène
Raf	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog
Ras	Rat sarcoma virus oncogene
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotation Per Minute

RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RT-semiqPCR	Real-Time semi-quantitative PCR
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
SA- $\beta$ gal	Senescence Associated $\beta$ - galactosidase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2/SH3	Src Homology 2/3
Shc	Transforming protein
SIPS	Sénescence Induite Prématurément par des Stress
SM22	Smooth Muscle Protein 22
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
Sos	Son Of Sevenless
SR	Sénescence rélicative
Src	Viral oncogene homolog
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR	T-cell Receptor
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
$\mu$ l	microlitre
UV	Ultra-Violet
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D- galactopyranoside

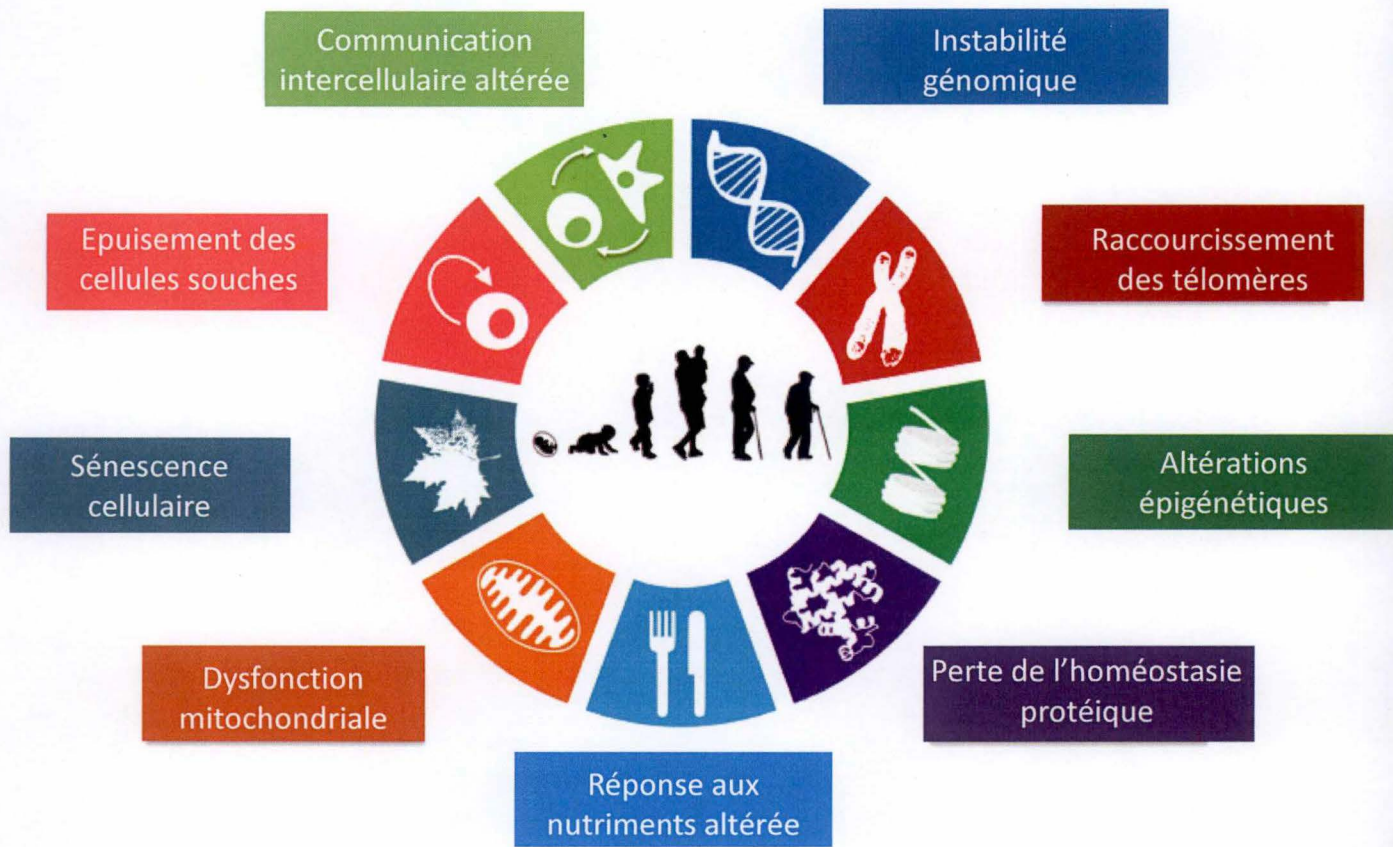


## TABLE DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.1. LE VIEILLISSEMENT .....</b>	<b>- 3 -</b>
1.1.1. DEFINITION .....	- 3 -
1.1.2. MARQUEURS DE VIEILLISSEMENT .....	- 3 -
1.1.2.1. Epuisement des cellules souches.....	- 3 -
1.1.2.2. Communication intercellulaire altérée.....	- 3 -
1.1.2.3. Instabilité génomique .....	- 4 -
1.1.2.4. Raccourcissement des télomères .....	- 4 -
1.1.2.5. Altérations épigénétiques .....	- 4 -
1.1.2.6. Perte de l'homéostasie protéique.....	- 5 -
1.1.2.7. Réponse aux nutriments modifiée .....	- 5 -
1.1.2.8. Dysfonction mitochondriale .....	- 5 -
1.1.3. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE.....	- 6 -
1.1.3.1. Les différents types de sénescence.....	- 6 -
1.1.3.1.1. Sénescence répllicative.....	- 6 -
1.1.3.1.2. Sénescence induite par les oncogènes (OIS) .....	- 6 -
1.1.3.1.3. Sénescence induite par les stress (SIPS) .....	- 6 -
1.1.3.2. Biomarqueurs de sénescence.....	- 7 -
1.1.3.2.1. Arrêt de la prolifération .....	- 7 -
1.1.3.2.2. Morphologie des cellules .....	- 7 -
1.1.3.2.3. Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal) .....	- 7 -
1.1.3.2.4. Raccourcissement des télomères.....	- 8 -
1.1.3.2.5. Délétion commune d'ADN mitochondrial.....	- 8 -
1.1.3.2.6. Modifications de l'expression génique et protéique.....	- 8 -
1.1.3.2.7. Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) .....	- 9 -
1.1.3.2.8. Perturbation de voies de signalisation.....	- 9 -
<b>1.2. LES RADEAUX LIPIDIQUES .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.2.1. DEFINITION ET CONCEPT .....	- 10 -
1.2.2. DIFFERENTS TYPES DE RADEAUX LIPIDIQUES .....	- 11 -
1.2.2.1. Radeaux lipidiques membranaires .....	- 11 -
1.2.2.2. Radeaux lipidiques cavéolaires .....	- 11 -
1.2.3. TECHNIQUES D'ETUDE DES RADEAUX LIPIDIQUES.....	- 12 -
1.2.3.1. Visualisation des radeaux lipidiques par de nouvelles techniques de microscopie .....	- 12 -
1.2.3.2. Etude des radeaux lipidiques par manipulation de leurs constituants .....	- 12 -
1.2.3.2.1. Séquestration du cholestérol .....	- 12 -
1.2.3.2.2. Traitement avec des statines .....	- 13 -
1.2.3.2.3. Utilisation de cholestérol oxydase .....	- 13 -
1.2.3.2.4. Cytolysines dépendantes du cholestérol.....	- 13 -
1.2.3.2.5. Utilisation de cyclodextrines.....	- 13 -
1.2.3.3. Marqueurs des radeaux lipidiques .....	- 14 -
1.2.4. ROLES.....	- 15 -
<b>1.3. LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE .....</b>	<b>- 15 -</b>
1.3.1. LA VOIE DEPENDANTE DE L'EGF-R .....	- 16 -
1.3.1.1. Structure et activation du récepteur.....	- 17 -
1.3.1.2. Voies de signalisation activées .....	- 17 -
1.3.1.3. Endocytose et dégradation .....	- 18 -
1.3.2. AUTRES VOIES DE SIGNALISATION .....	- 19 -
1.3.2.1. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF-R) .....	- 20 -
1.3.2.2. Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGF-R).....	- 20 -
1.3.2.3. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF-R) .....	- 20 -
1.3.2.4. Insulin Growth Factor Receptor (IGF-1R).....	- 20 -
1.3.3. SÉNESCENCE ET SIGNALISATIONS CELLULAIRES .....	- 20 -
<b>1.4. OBJECTIFS.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>2. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>2.1. CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>- 23 -</b>
2.1.1. CULTURE DES FIBROBLASTES .....	- 23 -
2.1.2. CULTURE DES KERATINOCYTES .....	- 24 -
<b>2.2. ACTIVITE B-GALACTOSIDASE ASSOCIEE A LA SÉNESCENCE (SA-BGAL) .....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>2.3. TRAITEMENTS APPLIQUES AUX CELLULES.....</b>	<b>- 25 -</b>
2.3.1. STIMULATION AVEC DE L'EGF .....	- 25 -



2.3.2.	TRAITEMENT AVEC DE LA METHYL-B-CYCLODEXTRINE (MBCD) .....	- 25 -
2.3.3.	TRAITEMENT AVEC UN INHIBITEUR DU DOMAINE TYROSINE KINASE DE L'EGF-R.....	- 26 -
2.4.	<b>ANALYSES EN PCR SEMI-QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (RT-qPCR).....</b>	<b>- 27 -</b>
2.4.1.	EXTRACTION ET DOSAGE D'ARN.....	- 27 -
2.4.2.	RETRO-TRANSCRIPTION.....	- 27 -
2.4.3.	PCR SEMI-QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	- 27 -
2.5.	<b>ANALYSES EN WESTERN BLOT .....</b>	<b>- 28 -</b>
2.5.1.	EXTRACTION DES PROTEINES .....	- 28 -
2.5.2.	DOSAGE PROTEIQUE.....	- 28 -
2.5.3.	WESTERN BLOT EN SDS-PAGE.....	- 29 -
2.6.	<b>ETUDES D'IMAGERIE.....</b>	<b>- 29 -</b>
2.6.1.	LOCALISATION DU RECEPTEUR A L'EGF : IMMUNOFLUORESCENCE.....	- 29 -
2.6.2.	LOCALISATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES : ANALOGUES DE LIPIDES FLUORESCENTS .....	- 30 -
2.6.3.	LOCALISATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES : LYSENINE .....	- 31 -
2.6.4.	DETECTION DU CHOLESTEROL CELLULAIRE PAR LA FILIPINE .....	- 31 -
2.7.	<b>CONTENU EN CHOLESTEROL .....</b>	<b>- 32 -</b>
2.7.1.	EXTRACTION DU CHOLESTEROL CELLULAIRE .....	- 32 -
2.7.2.	DOSAGE DU CHOLESTEROL CELLULAIRE .....	- 32 -
2.8.	<b>PATHSCAN ANTIBODY ARRAY.....</b>	<b>- 33 -</b>
2.9.	<b>ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>- 34 -</b>
3.	<b><u>RESULTATS.....</u></b>	<b><u>- 35 -</u></b>
3.1.	<b>BIOMARQUEURS DE SENESCENCE .....</b>	<b>- 35 -</b>
3.1.1.	MORPHOLOGIE DES FIBROBLASTES AU COURS DE LA SENESCENCE.....	- 35 -
3.1.2.	ACTIVITE B-GALACTOSIDASE ASSOCIEE A LA SENESCENCE .....	- 35 -
3.1.3.	EXPRESSION DE P16 <sup>INK-4A</sup> .....	- 35 -
3.2.	<b>EXPRESSION DU RECEPTEUR A L'EGF AU COURS DE LA SENESCENCE .....</b>	<b>- 36 -</b>
3.3.	<b>STIMULATION AVEC DE L'EGF .....</b>	<b>- 37 -</b>
3.3.1.	PROTOCOLE.....	- 37 -
3.3.2.	MORPHOLOGIE DES FIBROBLASTES .....	- 37 -
3.3.3.	AU NIVEAU PROTEIQUE.....	- 37 -
3.3.3.1.	Effet de la durée de déprivation en sérum.....	- 37 -
3.3.3.2.	Comparaison de la réponse entre cellules jeunes et sénescents .....	- 38 -
3.3.4.	LOCALISATION DU RECEPTEUR A L'EGF PAR IMMUNOFLUORESCENCE .....	- 38 -
3.3.4.1.	Effet du temps de stimulation .....	- 38 -
3.3.4.2.	Comparaison de la réponse entre cellules jeunes et sénescents .....	- 39 -
3.3.4.3.	Colocalisation avec LAMP-1 .....	- 39 -
3.3.5.	AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL .....	- 40 -
3.4.	<b>DEPLETION EN CHOLESTEROL.....</b>	<b>- 40 -</b>
3.4.1.	PROTOCOLE.....	- 41 -
3.4.2.	EFFET DE LA MBCD SUR LES FIBROBLASTES .....	- 41 -
3.4.2.1.	Morphologie des fibroblastes.....	- 41 -
3.4.2.2.	Dosage du contenu en cholestérol .....	- 41 -
3.4.2.2.1.	Dosage du cholestérol .....	- 41 -
3.4.2.2.2.	Marquage du cholestérol cellulaire grâce à la filipine.....	- 42 -
3.4.3.	TRAITEMENT AVEC DE LA MBCD .....	- 42 -
3.4.3.1.	Mise au point de la dose de MBCD .....	- 42 -
3.4.3.2.	Mise au point de la confluence.....	- 43 -
3.4.3.3.	Effet du temps de traitement et comparaison entre fibroblastes jeunes et sénescents .....	- 44 -
3.4.4.	LOCALISATION DU RECEPTEUR A L'EGF PAR IMMUNOFLUORESCENCE.....	- 45 -
3.4.5.	UTILISATION D'UN INHIBITEUR DE L'EGF-R.....	- 45 -
3.4.5.1.	Protocole .....	- 46 -
3.4.5.2.	Morphologie des fibroblastes.....	- 46 -
3.4.5.3.	Au niveau protéique.....	- 46 -
3.4.5.4.	Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence .....	- 47 -
3.4.6.	PATHSCAN ANTIBODY ARRAY .....	- 49 -
3.4.7.	MARQUAGE DE LA SPHINGOMYELINE .....	- 50 -
4.	<b><u>CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</u></b>	<b><u>- 52 -</u></b>
5.	<b><u>BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>	<b><u>- 57 -</u></b>
6.	<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>- 63 -</u></b>



**Figure 1: Les neuf caractéristiques du vieillissement.** Schéma des neuf caractéristiques du vieillissement : épuisement des cellules souches, communication intercellulaire altérée, instabilité génomique, raccourcissement des télomères, altérations épigénétiques, perte de l'homéostasie protéique, réponse aux nutriments altérée, dysfonction mitochondriale et sénescence cellulaire (D'après Lopez-Otin et al., 2013).



# **1. Introduction**

## **1.1. Le vieillissement**

### **1.1.1. Définition**

Le vieillissement est caractérisé par un ralentissement des fonctions physiologiques de l'organisme (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce ralentissement entraîne un déclin fonctionnel progressif associé à l'apparition de maladies liées à l'âge et à une incidence plus élevée à différentes pathologies telles que le cancer, la diabète, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Lopez-Otin et al., 2013).

### **1.1.2. Marqueurs de vieillissement**

Neuf caractéristiques principales du vieillissement ont été identifiées et liées à ce déclin physiologique. Cette liste de marqueurs est non exhaustive car l'étude du vieillissement est un domaine en plein essor et les chercheurs tentent de comprendre les relations qui existent entre ces différents marqueurs eux-mêmes et leur relation précise avec le vieillissement. La **figure 1** représente les marqueurs de vieillissement reconnus à ce jour (Lopez-Otin et al., 2013).

#### **1.1.2.1. Epuisement des cellules souches**

Le vieillissement est caractérisé par une perte du potentiel régénératif des cellules souches (Beerman and Rossi, 2014, Lopez-Otin et al., 2013). Ce déclin progressif du potentiel de régénération des cellules souches avec l'âge a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires. Par exemple, cela a notamment été remarqué dans les cellules souches hématopoïétiques humaines, dont le potentiel de renouvellement diminue avec l'âge. Ceci semble être à l'origine de la diminution du fonctionnement du système immunitaire et à une augmentation de cancers de la lignée lymphoïde notamment avec l'âge (Beerman and Rossi, 2014). Des études réalisées sur des modèles murins ont démontré un déclin général du renouvellement des cellules souches hématopoïétiques avec l'âge, favorisant l'apparition de dommages à l'ADN (Rossi et al., 2007). Des modifications du potentiel régénératif des cellules souches ont été également remarquées dans d'autres types cellulaires tels que les ostéoclastes et les ostéoblastes, avec une perturbation de l'équilibre entre ces deux types cellulaires. En effet, les ostéoclastes sont plus nombreux avec l'âge, ce qui favorise des pathologies telles que l'ostéoporose (Boyette and Tuan, 2014). Enfin, des études réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence un déclin dans la neurogenèse avec l'âge (Maslov et al., 2004).

#### **1.1.2.2. Communication intercellulaire altérée**

Les communications entre les cellules semblent être altérées avec le vieillissement. Ces altérations se manifestent notamment par une perturbation des signalisations endocrine,



neuroendocrine ou encore hormonale. Les conséquences de ces perturbations sont multiples, incluant notamment une augmentation des réactions inflammatoires ou encore un déclin de la réponse immunitaire (Lopez-Otin et al., 2013). Le phénotype pro-inflammatoire chronique observé avec l'âge chez les mammifères est aussi appelée « Inflammaging ». Il est le résultat de plusieurs causes qui sont une accumulation du tissu pro-inflammatoire, un défaut de la réponse immunitaire qui ne permet plus une élimination efficace des pathogènes et des cellules non fonctionnelles, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et enfin une réponse à l'autophagie déficiente. Ces altérations auront plusieurs conséquences telles que la libération de facteurs par les cellules endommagées reconnus comme pathogènes, menant à une réaction inflammatoire provoquée par l'activation de la réponse immunitaire (Franceschi and Campisi, 2014, Lopez-Otin et al., 2013) ou encore l'apparition de pathologies liées à une réaction inflammatoire trop importante telles que le diabète de type II ou l'athérosclérose.

#### 1.1.2.3. Instabilité génomique

Les cellules qui vieillissent possèdent plus de dommages à l'ADN que les cellules jeunes et ce aussi bien au niveau de l'ADN nucléaire que de l'ADN mitochondrial. De nombreuses maladies de vieillissement prématuré (telles que le syndrome de Bloom ou le syndrome de Werner) sont liées à des mutations de protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (Lopez-Otin et al., 2013). Les cellules sont continuellement soumises à des stress qui peuvent être d'origine endogène (dérivés actifs de l'oxygène, erreurs de réplication, ...) ou d'origine exogène (agents chimiques, rayonnement ultraviolet,...). Ces stress sont capables d'induire des dommages à l'ADN comprenant des mutations ponctuelles, des translocations ou des cassures simple ou double brin. Afin de remédier à ces dommages à l'ADN, les organismes ont développé des mécanismes de réparation de l'ADN, spécifiques du type de dommage subi par la cellule. Lorsque ces mécanismes de réparation sont insuffisants, cela favorise le vieillissement de la cellule.

#### 1.1.2.4. Raccourcissement des télomères

Les télomères sont de courtes régions d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes et protégeant leurs extrémités. Ils sont constitués d'une répétition d'une courte séquence nucléotidique (TTAGGG) chez les vertébrés. Ce raccourcissement est lié à l'activité de l'ADN polymérase, incapable de répliquer complètement les extrémités des chromosomes, entraînant un raccourcissement progressif des télomères à chacune des réplifications de la cellule (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce phénomène explique la capacité de vie proliférative limitée de certaines cellules cultivées *in vitro*, appelée la sénescence répllicative (Lopez-Otin et al., 2013, Tigges et al., 2014). Certaines cellules sont capables de régénérer ces télomères grâce à une ADN polymérase spécifique, appelée la télomérase, présente dans les cellules souches et certaines cellules cancéreuses (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

#### 1.1.2.5. Altérations épigénétiques

Le vieillissement est caractérisé par une série d'altérations épigénétiques telles que des modifications des histones, de la méthylation de l'ADN ou encore du remodelage de la chromatine (Brunet and Berger, 2014, Lopez-Otin et al., 2013). Il semblerait que les modifications post-traductionnelles de certaines histones soient modifiées avec le



vieillesse. Certaines histones voient leur méthylation augmenter (H4K20, H3K4) et d'autres la voient diminuer avec l'âge (H3K9, H3K27) (Lopez-Otin et al., 2013). La méthylation des histones étant un processus modulant l'expression de certains gènes, une modification des méthylations avec l'âge entraîne donc une modification de l'expression de ces gènes. Une hypométhylation globale de l'ADN est également associée à l'âge, modifiant ainsi les niveaux d'expression de certains gènes. En ce qui concerne l'activité de remodelage de la chromatine, il a été remarqué que certains complexes protéiques essentiels à cette activité, tel que le groupe protéique « polycomb », voient leur niveau d'expression diminuer avec l'âge (Lopez-Otin et al., 2013).

#### 1.1.2.6. Perte de l'homéostasie protéique

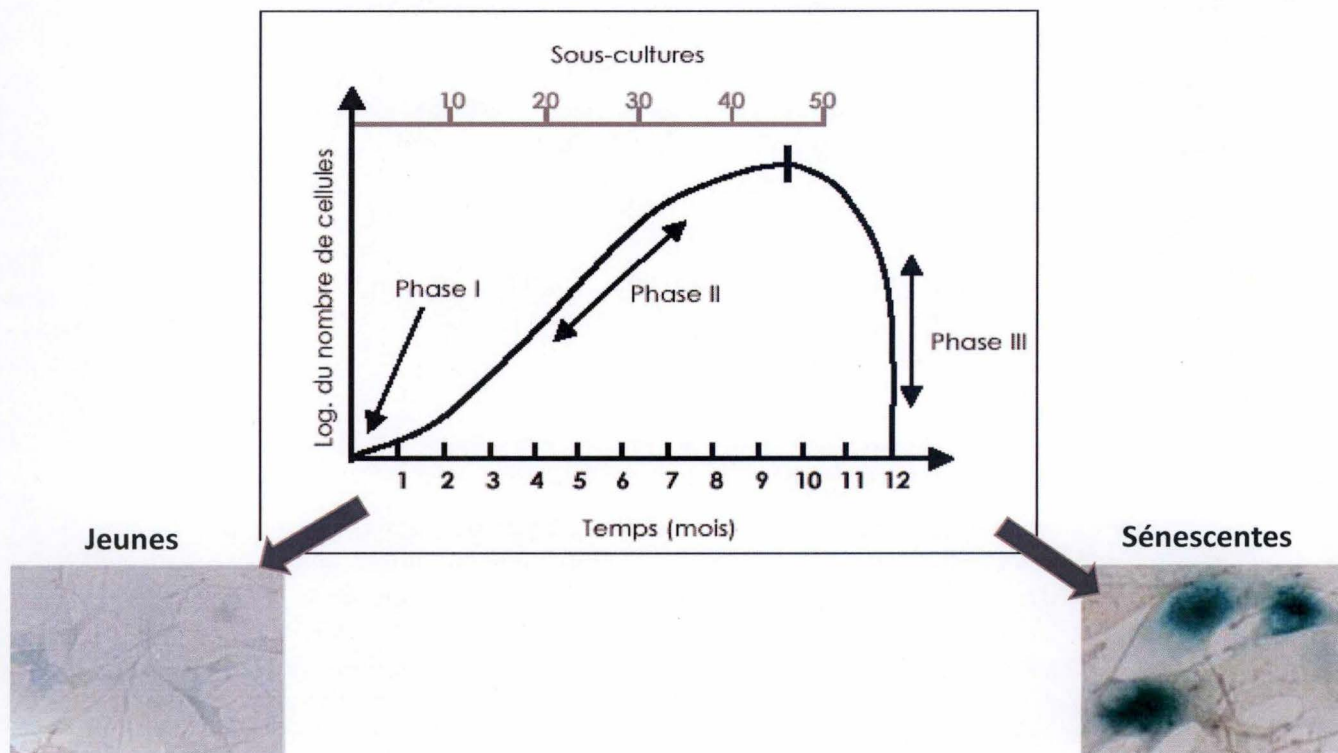
Les cellules sont continuellement soumises à des stress tels que des chocs thermiques, des stress oxydatifs ou encore des stress ressentis par le réticulum endoplasmique pouvant mener à la formation de protéines tronquées. Dans une cellule jeune, des mécanismes existent afin soit de reformer la protéine sous une forme fonctionnelle, via les « heat-shock proteins », soit de détruire les protéines tronquées via le protéasome ou l'autophagie. De nombreuses études démontrent que ce système est altéré avec l'âge, menant à l'accumulation de protéines tronquées (Lopez-Otin et al., 2013, Saez and Vilchez, 2014). Ces dernières peuvent créer des agrégats protéiques, dont l'accumulation est responsable de l'apparition de pathologies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la cataracte (Lopez-Otin et al., 2013) ou encore la maladie de Huntington (Hipp et al., 2014).

#### 1.1.2.7. Réponse aux nutriments modifiée

La régulation des voies de signalisation impliquées dans la réponse aux nutriments, telle que la voie de réponse à l'insuline, est importante pour la cellule. Les cellules âgées sont caractérisées par des modifications dans l'expression de molécules de signalisation de ces voies, ces modifications favorisant la signalisation anabolique. Le rôle de la perturbation de ces voies a notamment été démontré par le fait qu'une restriction alimentaire chez des organismes eucaryotes augmente la durée de vie. De plus, certains syndromes progéroïdes caractérisés par un vieillissement prématuré montrent un niveau relativement bas du récepteur à l'insuline 1 (Lopez-Otin et al., 2013).

#### 1.1.2.8. Dysfonction mitochondriale

Avec l'âge, l'efficacité de la chaîne respiratoire diminue, provoquant une diminution de la production d'ATP. De plus, une dysfonction mitochondriale est associée à l'âge. Cette dernière peut être aussi bien provoquée par des délétions de l'ADN mitochondrial, que par des problèmes internes à la mitochondrie tels qu'une mitophagie défective ou encore des processus de fusion et de fission altérés (Lopez-Otin et al., 2013).



**Figure 2: La sénescence répliative.** Les cellules sont mises en culture à partir d'une biopsie (Phase I) puis prolifèrent rapidement jusqu'à atteindre un sommet (Phase II) à partir duquel les cellules arrêtent irrémersiblement de se diviser (Phase III) (D'après Hayflick, 1977). Entre des cellules jeunes et sénescentes on observe également une modification de la morphologie et de l'expression de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (D'après Bandyopathy et al., 2005).



### 1.1.1. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire constitue le dernier marqueur du vieillissement. Elle est caractérisée par l'arrêt définitif des divisions cellulaires, phénomène mis en évidence pour la première fois par Léonard Hayflick dans les années 1960 (Hayflick and Moorhead, 1961).

#### 1.1.1.1. Les différents types de sénescence

##### 1.1.1.1.1. *Sénescence répllicative*

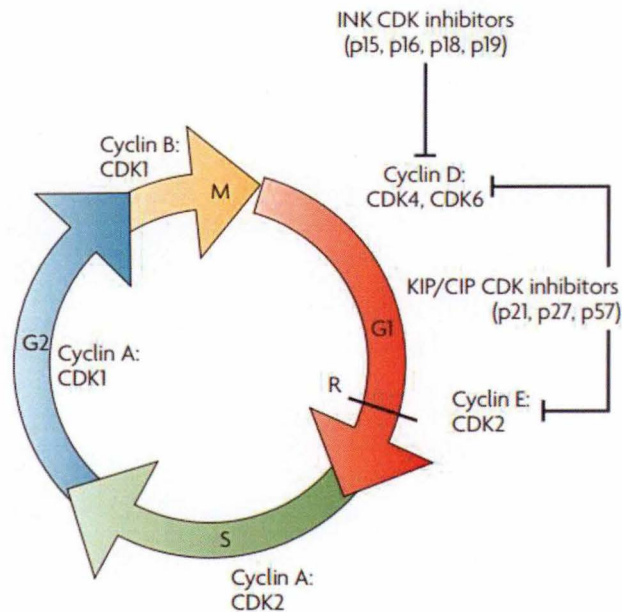
La sénescence répllicative est définie comme l'arrêt définitif de prolifération des cellules mises en culture (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce phénomène a été décrit au début des années 60 par Léonard Hayflick qui travaillait alors sur des cultures de fibroblastes humains. Il a remarqué que les fibroblastes prolifèrent assez rapidement au début de la culture, puis que leur prolifération ralentit jusqu'à atteindre une phase dite de plateau, à partir de laquelle les fibroblastes cessent totalement de se diviser et meurent progressivement (Hayflick and Moorhead, 1961). Cet arrêt irréversible des divisions a été appelé sénescence répllicative et a depuis lors été remarqué dans d'autres types cellulaires tels que : les mélanocytes (Medrano et al., 1994) ; les kératinocytes (Kang et al., 1998) ou encore les cellules nerveuses (Tan et al., 2014). Depuis lors, d'autres biomarqueurs de sénescence ont été identifiés (voir ci-dessous). La sénescence peut également être induite par des oncogènes ou par des stress.

##### 1.1.1.1.2. *Sénescence induite par les oncogènes (OIS)*

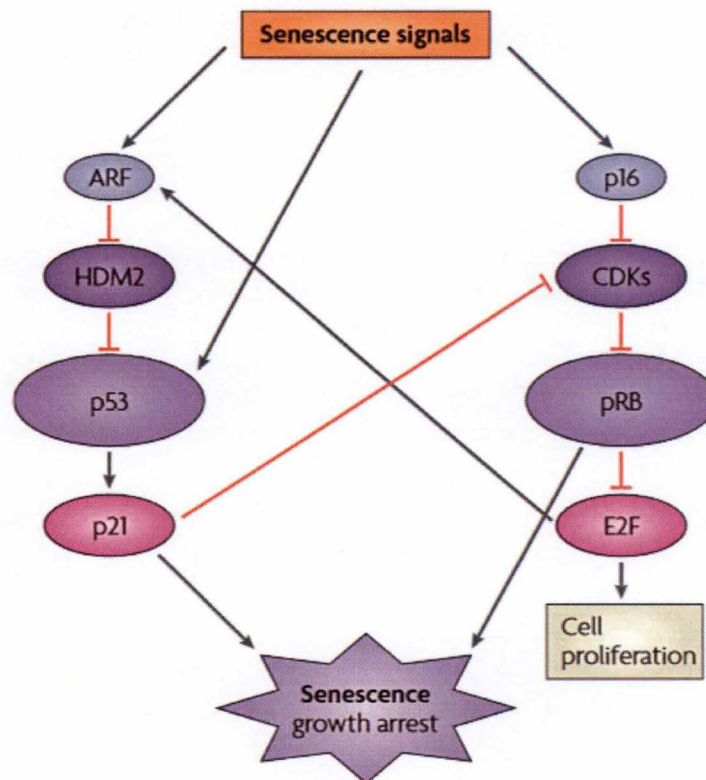
Suite à l'activation d'un oncogène ou à la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur, la cellule peut entrer dans un état de sénescence, qu'on appellera alors sénescence induite par les oncogènes (OIS) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce type de sénescence a d'abord été identifié suite à l'apparition de la sénescence lorsqu'une forme oncogénique de Ras (Ras V12) est introduite dans des fibroblastes normaux (Serrano et al., 1997). L'arrêt de la prolifération se fait notamment grâce aux voies dépendantes de p16<sup>INK-4A</sup> et de p53. Les cellules peuvent devenir cancéreuses lorsqu'elles parviennent à déjouer ce processus et éviter l'état de sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

##### 1.1.1.1.3. *Sénescence induite par les stress (SIPS)*

D'autre part, la sénescence peut également être induite par des stress chroniques ou aigus : c'est la Sénescence Induite Prématûrement par les Stress (SIPS) (Toussaint et al., 2000). De nombreux agents stressants sont capables d'induire la sénescence des cellules, qu'ils induisent un stress oxydatif et/ou des dommages à l'ADN (Toussaint et al., 2002a, Toussaint et al., 2002b, Toussaint et al., 2002c). Des modèles de SIPS ont ainsi été développés en soumettant des fibroblastes humains à une exposition unique au peroxyde d'hydrogène (Frippiat et al., 2001) ou à des expositions répétées au *tert*-butylhydroperoxyde (Dumont et al., 2001, Li et al., 2013), à l'éthanol (Debacq-Chainiaux et al., 2008) ou aux UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).



**Figure 3: Représentation schématique du cycle cellulaire.** Le cycle cellulaire est composé de 4 phases (M = Mitose ; G1 = Croissance 1 ; S = Synthèse de l'ADN ; G2 = Croissance 2). La progression à travers ces 4 phases est régulée grâce à l'association entre les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et des cyclines (D'après Dehay and Kennedy, 2007).



**Figure 4: Contrôle de l'arrêt de la prolifération lors de la sénescence par les voies dépendantes de p53 et de p16<sup>INK-4A</sup>.** Le déclenchement de ces voies est régulé par l'apparition de stress cellulaires tels que le raccourcissement des télomères ou les dommages à l'ADN. L'activation du facteur de transcription p53 mène à l'expression de la protéine p21, inhibitrice de kinases dépendantes des cyclines. Cette dernière provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'expression de la protéine p16<sup>INK-4A</sup> mène à une inhibition de la protéine du rétinoblastome (pRB), inhibant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S (D'après Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).



### 1.1.3.2. Biomarqueurs de sénescence

#### 1.1.3.2.1. Arrêt de la prolifération

Le premier biomarqueur de la sénescence cellulaire est l'arrêt irréversible des divisions (Hayflick and Moorhead, 1961). L'évolution de la culture cellulaire peut ainsi être divisée en trois phases. La première phase correspond à une remise en culture des cellules à partir de la biopsie. La deuxième phase correspond à une prolifération régulière et rapide atteignant un sommet à partir duquel les cellules arrêtent irrévérablement de se diviser, cette dernière étape correspondant à la phase 3 (**Figure 2**). Les cellules sénescents ne prolifèrent plus mais peuvent rester métaboliquement actives pendant plusieurs mois, puis elles finiront par mourir. Les cellules sénescents sont bloquées dans la phase G1 du cycle cellulaire, et sont incapables d'initier un nouveau cycle de réplication de leur ADN (**Figure 3**). Cet arrêt est initié par l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p21 et p16<sup>INK-4A</sup>, qui sont des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKI) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ces deux voies d'arrêt de prolifération sont engagées suite à une réponse de dommages à l'ADN. Elles peuvent interagir entre elles. L'activation du facteur de transcription p53 dépend de l'expression de la protéine ARF (Alternate Reading Frame Protein) dont le rôle est d'inhiber HDM2, une ubiquitine ligase de type E3 qui, sous forme active, est responsable de la régulation négative de p53. Son inhibition entraîne donc la régulation positive du facteur de transcription p53, qui induit l'expression de p21. De son côté, la protéine p16<sup>INK-4A</sup> via son activité inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines, prévient l'inactivation de la protéine du rétinoblastome (pRB) par les kinases dépendantes des cyclines. Une protéine RB active permet d'inhiber l'activité de E2F, un facteur de transcription qui stimule l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire.

Des interactions entre ces deux voies d'arrêt du cycle cellulaire existent puisque p21 est capable lui aussi de prévenir l'inactivation de la protéine RB (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (**Figure 4**).

#### 1.1.3.2.2. Morphologie des cellules

En plus de leur arrêt de prolifération, les cellules sénescents vont acquérir une morphologie typique : elles vont s'allonger et s'élargir (Hayflick, 1965). Ce biomarqueur constitue un premier signe de sénescence cellulaire (**Figure 2**).

#### 1.1.3.2.3. Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal)

L'activité de la  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase- SA- $\beta$ gal) a été identifiée en 1995 par l'équipe de Dimri (Dimri et al., 1995). La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme lysosomale active à pH 4,0 chez toutes les cellules et qui est surexprimée chez les cellules sénescents (Lee et al., 2006). Hyper abondante chez les cellules sénescents, son activité est alors détectée à un pH suboptimal de 6,0 (Gary and Kindell, 2005). Ce biomarqueur peut être facilement étudié au laboratoire sur des cellules cultivées *in vitro* et permet de quantifier la proportion de cellules sénescents dans la culture (**Figure 2**). Pour cela, les cellules sont fixées et incubées dans un tampon à pH 6,0 en présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). La  $\beta$ -galactosidase active clive le X-gal, ce qui provoque une réaction chromogénique colorant les cellules



sénescentes en bleu (Debacq-Chainiaux et al., 2009, Dimri et al., 1995). Ce biomarqueur peut également être utilisé sur des coupes de tissu *ex vivo* (Dimri et al., 1995).

#### *1.1.3.2.4. Raccourcissement des télomères*

La longueur des télomères diminue au fil des passages en culture. Ce phénomène, dont le mécanisme est expliqué dans le point 1.1.2.4., a été historiquement la première cause de sénescence cellulaire mise à jour. En effet, ce raccourcissement a souvent été représenté comme une horloge mitotique « comptant » le nombre de divisions cellulaires. Lorsque ce raccourcissement a atteint une longueur « critique », il entraîne une réponse de dommages à l'ADN, provoquant l'arrêt des divisions cellulaires (Aubert and Lansdorp, 2008, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007, Rodier and Campisi, 2011). Certaines cellules, notamment les cellules cancéreuses ou encore les cellules germinales, expriment une enzyme permettant de maintenir constante la longueur des télomères : la télomérase (Aubert and Lansdorp, 2008, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007, Rodier and Campisi, 2011). Il s'agit d'une enzyme, de type transcriptase inverse, capable de resynthétiser les petites séquences d'ADN perdues lors de la réplication (Aubert and Lansdorp, 2008, Campisi, 2013, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007, Rodier and Campisi, 2011). Les cellules cancéreuses ont un phénotype « immortel » notamment dû à l'expression de cette activité télomérase. Cette dernière est même qualifiée comme une caractéristique majeure du cancer et est une cible privilégiée dans la recherche de thérapies anti-cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

#### *1.1.3.2.5. Délétion commune d'ADN mitochondrial*

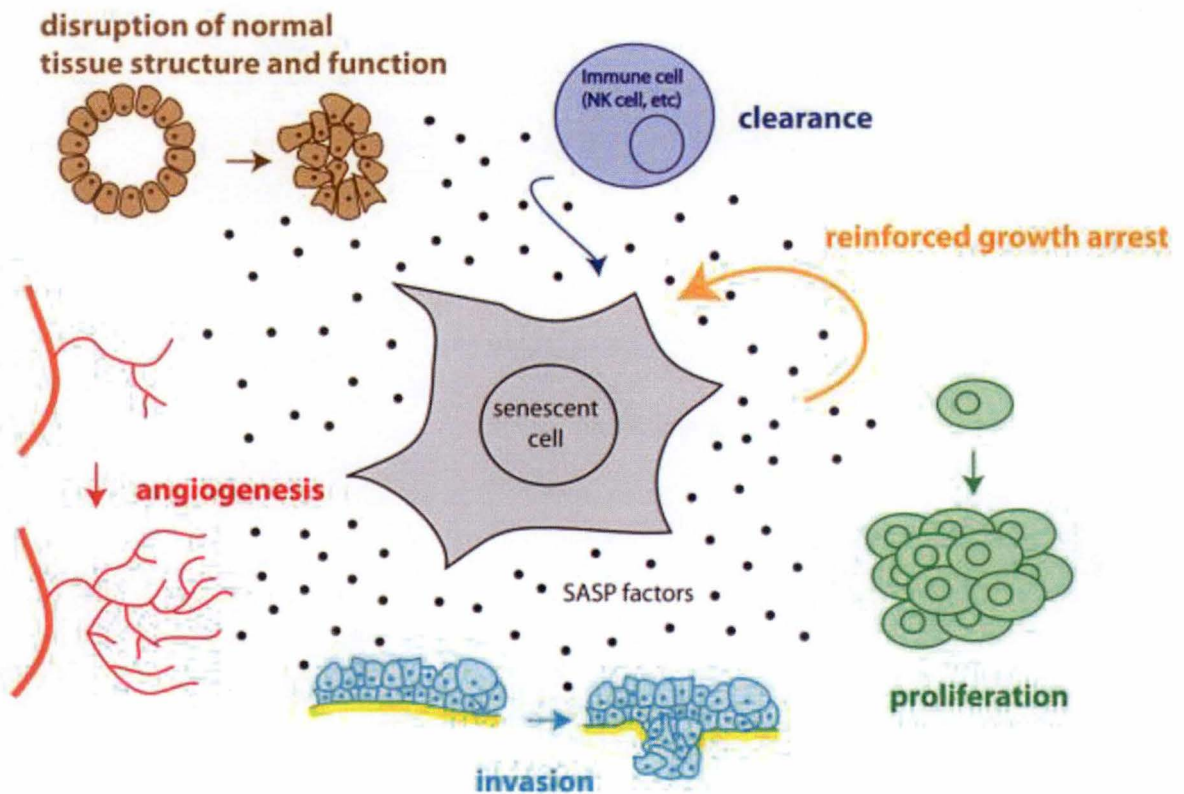
Des nombreuses modifications de l'ADN mitochondrial sont associées à la sénescence. Parmi celles-ci, il existe une délétion dite « commune » de 4977 paires de bases. L'incidence de cette délétion augmente lors de la sénescence *in vitro* (Dumont et al., 2000) ainsi que lors du vieillissement *in vivo*, notamment dans la peau (Yang et al., 1994) ou le muscle squelettique (Lee et al., 1994).

#### *1.1.3.2.6. Modifications de l'expression génique et protéique*

Les cellules sénescentes montrent des changements dans leur expression génique et protéique. Les gènes dont l'expression est modifiée avec la sénescence peuvent être classés en différentes catégories. Tout d'abord, il y a une modification des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, principalement une surexpression des gènes codant des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines p21 et p16<sup>INK-4A</sup>.

Il existe également des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans des fonctions spécifiques comme le remodelage de la matrice extracellulaire (surexpression des gènes codant les métalloprotéinases matricielles, MMP-3 et -12), l'inflammation (surexpression des gènes codant les interleukines IL-1, -7 et -12, FAS,...). Ces modifications d'expression de cytokines inflammatoires sont liées à l'apparition de maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaque ou encore les infections (Kim et al., 2013).

Enfin, certains gènes sont dits « associés à la sénescence » car leur expression est augmentée avec la sénescence. Il s'agit de gènes tels que les Insulin-like Growth Factor-binding Protein (IGFBP3 et IGFBP5), l'apolipoprotéine J, la fibronectine, l'ostéonectine,...



**Figure 5: Effet du Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) sur le microenvironnement de la cellule sénescence.** Les facteurs sécrétés du SASP d'une cellule sénescence peuvent être bénéfiques car ils renforcent le signal d'arrêt de croissance d'une part et peuvent d'autre part éliminer les cellules sénescences via le système immunitaire. Les facteurs sécrétés du SASP peuvent également être délétères car certaines cytokines et facteurs inflammatoires sont responsables de l'apparition d'une inflammation chronique et certains facteurs favorisent la transformation cancéreuse, l'angiogénèse, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses dans le tissu (D'après Freund et al., 2010).



#### *1.1.3.2.7. Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP)*

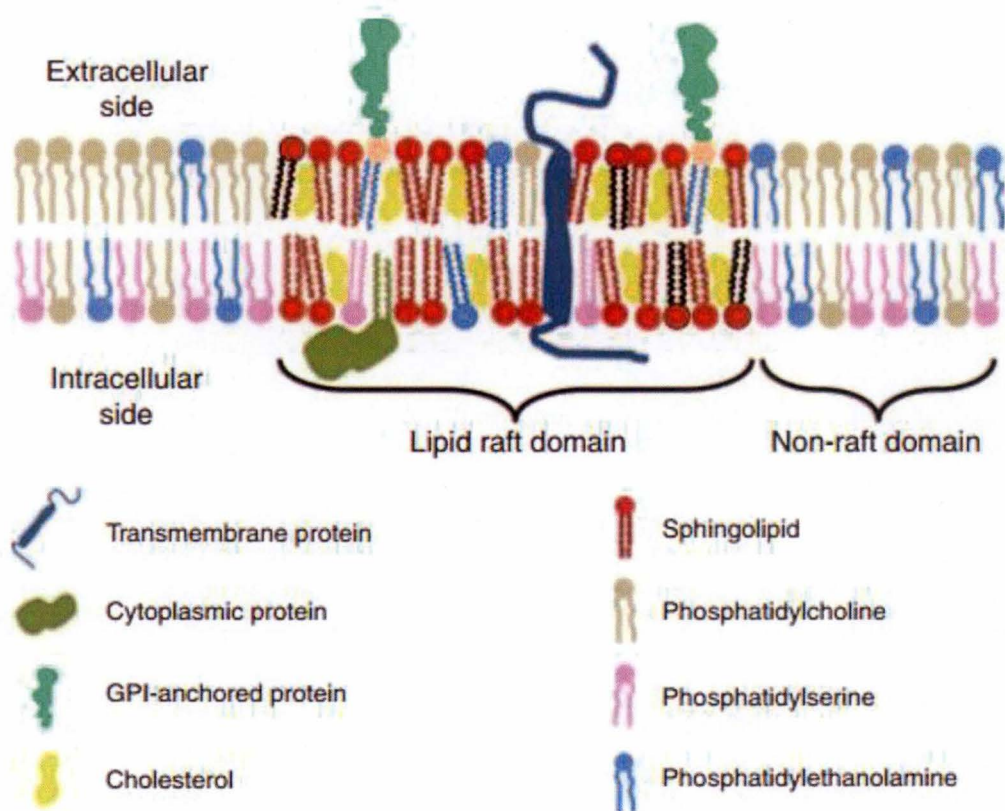
Les cellules sénescentes surexpriment une série de protéines sécrétées et développent ainsi ce que l'on appelle le Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP) (Campisi, 2013). Ce SASP permet à la cellule sénescence de communiquer avec son environnement (**Figure 5**). En effet, ce SASP a non seulement des effets sur la cellule sénescence elle-même (effet autocrine) mais également sur les cellules voisines (effet paracrine). Les sécrétions du SASP sont multiples, se regroupant en plusieurs familles de facteurs solubles et insolubles tels que des cytokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des protéases sécrétées et des protéines insolubles sécrétées qui peuvent être des composantes de la matrice extracellulaire (Coppe et al., 2010). Ces facteurs sécrétés permettent aux cellules sénescences de moduler leur micro-environnement (Velarde et al., 2013). Certains facteurs sécrétés par le SASP ont un effet bénéfique pour la cellule sénescence. Par un effet autocrine, la cellule sénescence est capable de renforcer le signal d'arrêt de croissance, permettant de limiter la formation des cellules cancéreuses. Ces facteurs sécrétés par les cellules sénescences interagissent avec les voies p53 et p16<sup>INK-4A</sup>/pRB. Grâce à un effet paracrine, la cellule sénescence est responsable d'envoyer un signal vers le système immunitaire afin d'éliminer les cellules sénescences. Mais les facteurs sécrétés par le SASP peuvent également avoir un effet délétère pour les cellules. Le SASP a notamment un effet sur l'inflammation chronique observée avec le vieillissement, via la sécrétion de diverses cytokines inflammatoires telles que des interleukines ou encore via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Freund et al., 2010). Ce dernier semble être induit par des stress génotoxiques tels que des radiations ionisantes ou encore le raccourcissement des télomères. Il peut également être transcrit en tant que réponse de dommages à l'ADN. L'induction de l'expression de NF- $\kappa$ B semble être à la base de la sécrétion des facteurs inflammatoires du SASP. L'inflammation chronique médiée par le SASP provient de l'activation d'un simple stimulus inflammatoire, qui se transformera en une réponse inflammatoire systémique due aux nombreuses boucles de rétro-action positives que les cellules immunitaires et les cytokines sont capables d'activer.

Le potentiel pro-inflammatoire créé par le SASP permet également de promouvoir la progression tumorale. En effet, le SASP peut induire la prolifération cellulaire grâce à la sécrétion de facteurs tels que le VEGF ou encore l'interleukine-7, capable de stimuler la prolifération des lymphocytes. Le SASP est également capable de stimuler la mobilité cellulaire en sécrétant toute une série de facteurs capables d'augmenter l'invasivité et la motilité des cellules. Le SASP est également capable de réguler la différenciation cellulaire des cellules voisines, par exemple grâce au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (Coppe et al., 2010, Freund et al., 2010).

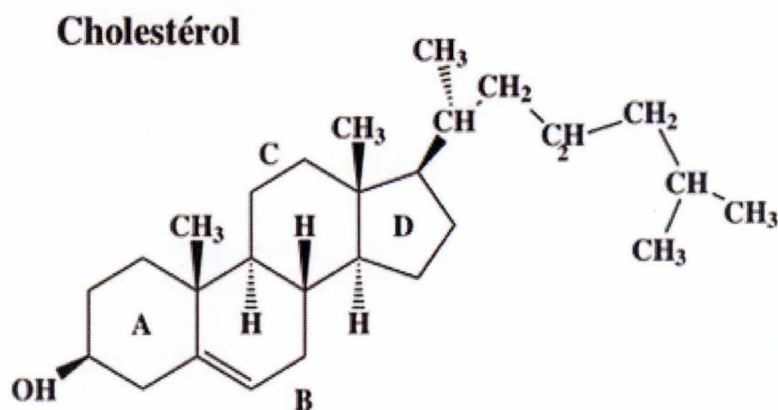
#### *1.1.3.2.8. Perturbation de voies de signalisation*

Avec l'âge, la signalisation assurée par les récepteurs semble perturbée. Plusieurs hypothèses sont décrites dans la littérature afin de comprendre les causes de cette perturbation de la signalisation. Premièrement, le vieillissement est caractérisé par une perte d'expression des récepteurs (Robert and Fulop, 2014, Robert et al., 2010). Le premier récepteur dont l'analyse a montré une diminution de son abondance est le récepteur  $\beta$ -adrénergique du cœur (Hardouin et al., 1993). La perturbation de ces voies de signalisation peut également être due à une diminution de l'efficacité des molécules de signalisation. Ce phénomène est extrêmement bien décrit dans le cas du système immunitaire (Fulop et al., 2012). En effet, le nombre de récepteurs de lymphocytes T (TCR) ne semble pas diminuer avec l'âge, mais ce sont plutôt les molécules co-stimulatrices, nécessaires à l'activation de lymphocytes T qui sembleraient





**Figure 6: Représentation schématisée d'un radeau lipidique.** La membrane plasmique contient des microdomaines membranaires d'une taille variant de 10 à 200 nm appelés radeaux lipidiques. Ceux-ci sont enrichis en cholestérol, en sphingolipides et sont associés à des protéines importantes pour la signalisation cellulaire telles que des protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), des protéines transmembranaires ou encore des protéines attachées à la membrane interne (D'après El-Sayed and Harashima, 2013).



**Figure 7: Molécule de cholestérol.** (<http://biochimej.univ-angers.fr>)

diminuer avec l'âge et donc être en partie responsable de la diminution de l'efficacité du système immunitaire observée avec l'âge. De plus, il semblerait que la perte d'efficacité soit aussi associée à la modification dans la distribution des radeaux lipidiques avec l'âge. Il apparaît en effet que chez un sujet jeune, les radeaux lipidiques sont distribués de manière homogène sur la membrane du lymphocyte et qu'en stimulant la cellule, ils se regroupent. Chez un sujet âgé, les radeaux lipidiques semblent être distribués de manière moins homogènes et se regroupent moins bien quand la cellule est stimulée (Fulop et al., 2012).

## **1.2. Les radeaux lipidiques**

### **1.2.1. Définition et concept**

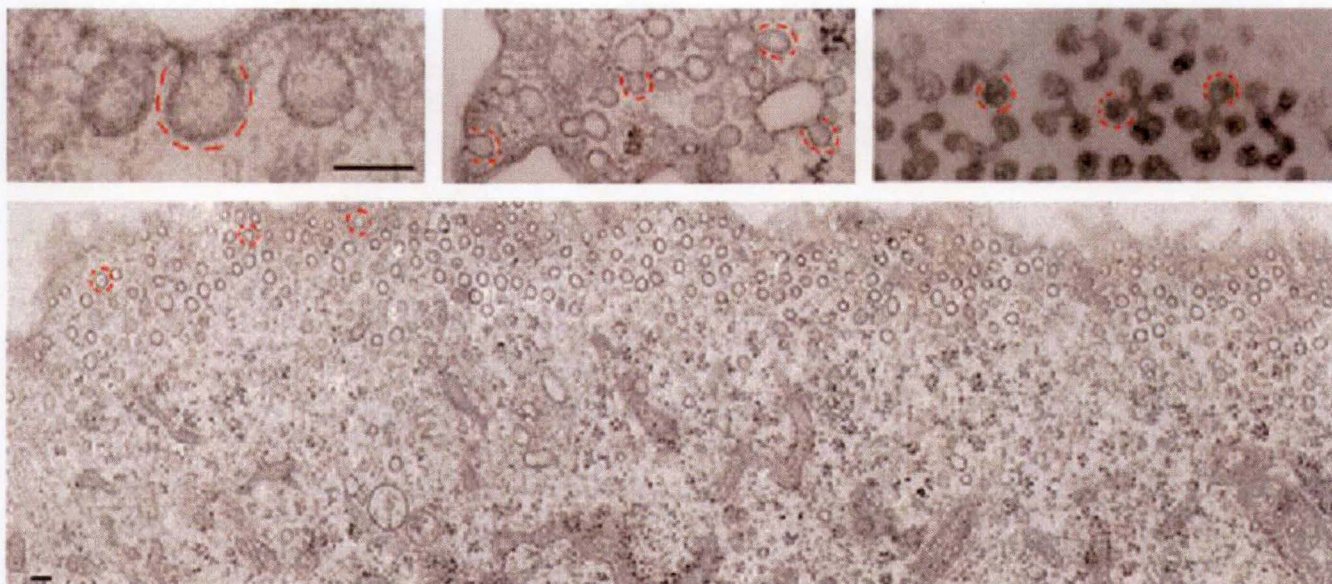
Le modèle de membrane en tant que structure fluide, comprenant des lipides et des protéines a été décrit il y a plus de 40 ans par Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972). Depuis lors, le modèle n'a cessé d'évoluer. Cette évolution est marquée depuis plusieurs années par l'intérêt porté dans le concept des radeaux lipidiques. Ces derniers sont définis de manière générale comme étant des microdomaines membranaires, d'une taille variant de 10 à 200 nm (El-Sayed and Harashima, 2013, Klotzsch and Schutz, 2013) enrichis en cholestérol et en sphingolipides, et associés à des protéines pouvant être des protéines à ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), des protéines transmembranaires ou encore des protéines attachées à la membrane interne (Munro, 2003, Pike, 2003, Shaw, 2006, Simons and Gerl, 2010) (**Figure 6**). L'hypothèse maintenue par de nombreux scientifiques est que ces radeaux lipidiques ont un rôle dans la signalisation cellulaire puisqu'ils sont associés à des protéines importantes dans la transduction du signal. Ils sont également impliqués dans le trafic des membranes, l'endocytose et le bourgeonnement des virus (El-Sayed and Harashima, 2013, Simons and Gerl, 2010, Simons and Ikonen, 1997). Les radeaux lipidiques ont pu être isolés du reste de la membrane plasmique grâce à leur propriété d'insolubilité dans des détergents classiques tels que le Triton X-100 à 4°C. Cette particularité leur a valu le nom de « membrane résistante aux détergents » (Pike, 2003, Simons and Gerl, 2010, Simons and Ikonen, 1997, Simons and Toomre, 2000). En réalisant un gradient de sucrose, il est possible de les isoler grâce à cette insolubilité. Ils vont en effet se retrouver dans les fractions supérieures du gradient (Pike, 2003).

Un autre critère intéressant des radeaux lipidiques est qu'ils sont fortement enrichis en cholestérol. Pour rappel, le cholestérol est une molécule constituée de quatre cycles, d'une fonction hydroxyle et d'une queue hydrophobe (**Figure 7**). Cette conformation lui confère un caractère amphipathique, retrouvé également chez les phospholipides de la membrane, et lui permet de s'insérer aisément dans les membranes biologiques (Yeagle, 1985). Le fait que les radeaux lipidiques soient enrichis en cholestérol rend leur existence dépendante de ce composé. Dès lors, de nombreuses études des radeaux lipidiques se basent sur l'impact de la perturbation de leur contenu en cholestérol (Castro et al., 2013).

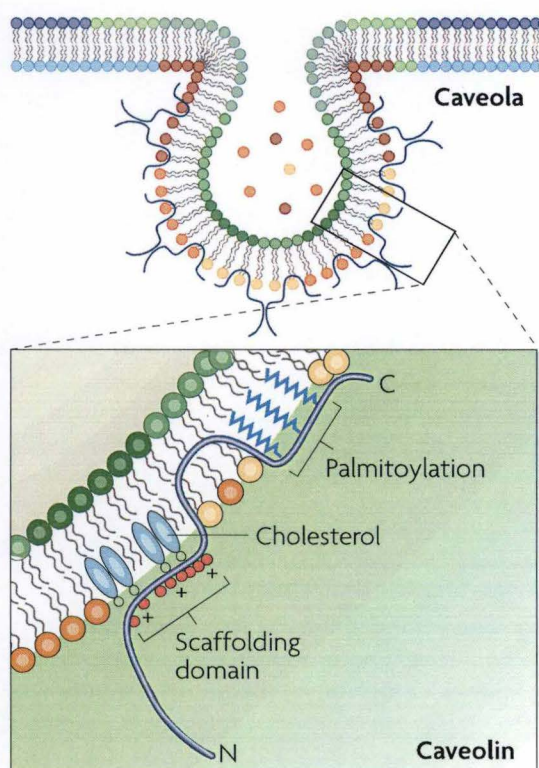
Il est clair que ces radeaux lipidiques suscitent un certain engouement depuis un certain temps dans la communauté scientifique, en dépit du fait que certains chercheurs restent sceptiques quant à leur existence-même au sein des membranes biologiques, ceci étant dû notamment à la difficulté de les observer et de les identifier directement (Shaw, 2006).



A



B



**Figure 8: Représentation des cavéoles.** **A.** Micrographies électroniques de cavéoles dans des fibroblastes (grande image et image au-dessus à gauche), dans des adipocytes (au-dessus au milieu) et dans des cellules musculaires squelettiques (au-dessus à droite) (barre d'échelle = 100 nm) (D'après Parton and Del-Pozo, 2013). **B.** Représentation schématique d'une cavéole et de la manière dont la cavéoline est insérée dans la membrane de la cavéole (D'après Parton and Simons, 2007).



### 1.2.2. Différents types de radeaux lipidiques

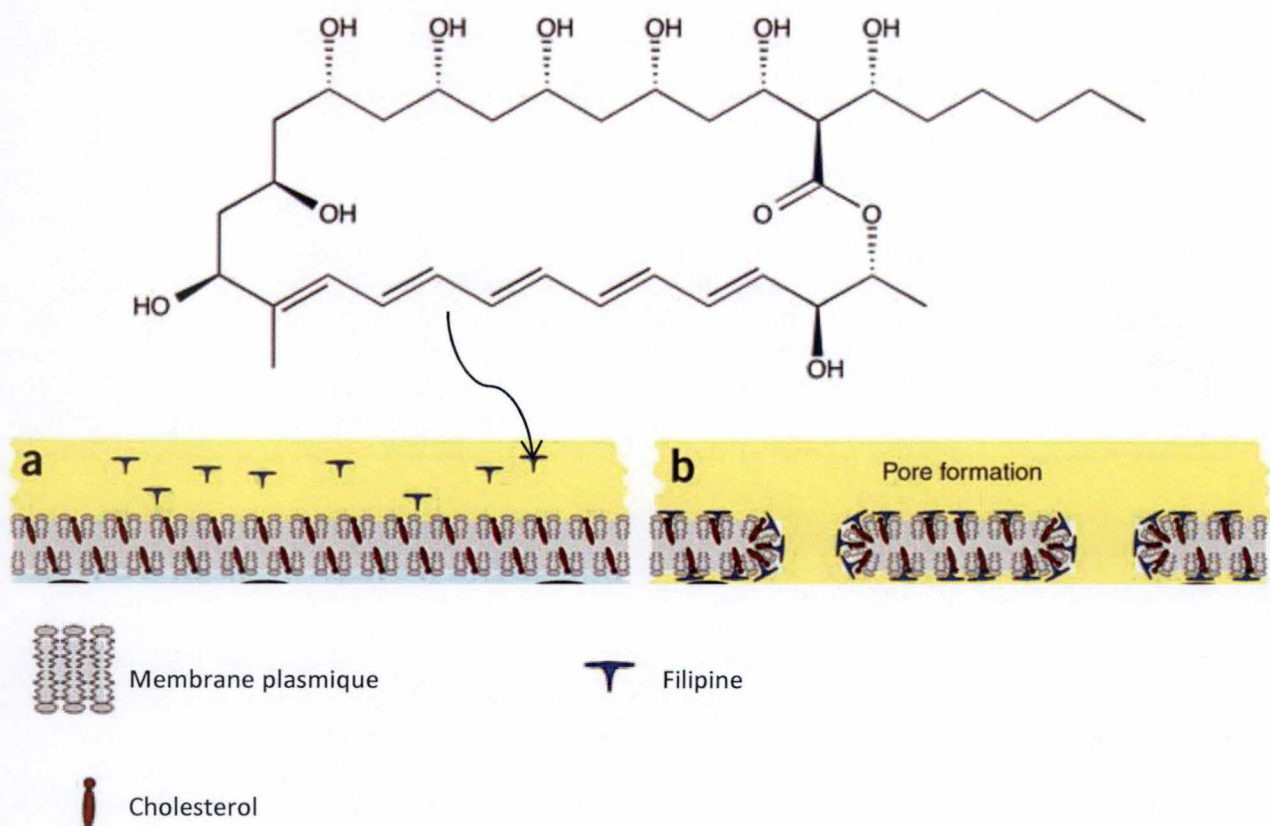
Si les radeaux lipidiques ont été sujets à controverse au sein de la communauté scientifique, c'est notamment dû au fait qu'ils semblent exister sous différentes formes au niveau de la cellule : les radeaux lipidiques membranaires et cavéolaires.

#### 1.2.2.1. Radeaux lipidiques membranaires

Les radeaux lipidiques membranaires sont formés de différents composants de la membrane plasmique, tels que des lipides (sphingolipides, cholestérol) et des protéines associées à la signalisation cellulaire. Ces radeaux lipidiques sont donc représentés comme des organisations membranaires enrichies en cholestérol et en sphingolipides dynamiques et d'une taille nanométrique qui, suite à une stimulation, forment des domaines plus larges, plus stables, et permettent des interactions entre lipides, entre protéines et entre lipides et protéines (Simons and Gerl, 2010). Ces domaines plus larges sont alors visibles en microscopie électronique (Kusumi et al., 2004, Schuck and Simons, 2004).

#### 1.2.2.2. Radeaux lipidiques cavéolaires

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de puits, d'une taille variant de 60 à 80 nm (Lajoie and Nabi, 2010, Parton and del Pozo, 2013, Parton and Simons, 2007) (**Figure 8a**). Ces invaginations ont pu être identifiées pour la première fois dans les années 1950 grâce à la microscopie électronique (Palade, 1953). Il semblerait que ces structures soient impliquées dans des processus tels que l'endocytose et la transcytose (Parton and Simons, 2007), mais encore dans la signalisation cellulaire (Lisanti et al., 1995). Les cavéoles peuvent être isolées car elles sont composées d'une grande quantité de molécules de cavéoline, qui s'insère en tête d'épingle dans la membrane de la cavéole (Lajoie and Nabi, 2010, Parton and del Pozo, 2013, Parton and Simons, 2007) (**Figure 8b**). La cavéoline est présente sous trois isoformes différentes : les cavéolines-1 et -2, présentes dans toutes les cellules non musculaires, et la cavéoline-3 présente dans les muscles (Lajoie and Nabi, 2010, Parton and Simons, 2007). L'hypothèse formulée est que les cavéoles sont une forme de radeaux lipidiques, car elles semblent avoir besoin de cholestérol pour être fonctionnelles (Rothberg et al., 1992) et car elles sont également constituées de lipides tels que des sphingolipides et des glycosphingolipides, qui sont également retrouvés dans les radeaux lipidiques membranaires (Parton and Simons, 2007). De plus, les cavéoles sont également insolubles dans des détergents classiques à 4°C (Kurzchalia and Parton, 1999). Les cavéoles semblent avoir un rôle important dans la signalisation cellulaire car elles sont responsables de la séquestration de certaines protéines de la signalisation cellulaires telles que NOS (Nitric Oxyde Synthase) (Feron and Balligand, 2006, Ju et al., 1997, Lajoie and Nabi, 2010, Parton and del Pozo, 2013, Zou et al., 2012), des tyrosines kinases de type *Src* (Li et al., 1996), des protéines G (Li et al., 1995) ou encore de l'EGF-R (Mineo et al., 1996).



**Figure 9: Représentation schématique de la filipine et de son mode d'action.** La filipine exerce son action en se liant aux stérols de la membrane plasmique, perturbant cette dernière en formant des pores (D'après focus biomolécules et Kuznetsov et al., 2008).



### 1.2.3. Techniques d'étude des radeaux lipidiques

Si les radeaux lipidiques alimentent autant la controverse au sein de la communauté scientifique, c'est parce qu'ils sont difficiles à identifier de manière directe. Cependant, au cours des dernières années, des techniques émergentes ont vu le jour et permettent une étude simplifiée et plus précise de ces composants.

#### 1.2.3.1. Visualisation des radeaux lipidiques par de nouvelles techniques de microscopie

De nouvelles techniques de microscopie ont été utilisées afin d'étudier les radeaux lipidiques car ceux-ci ne sont pas observables par microscopie optique classique. Parmi ces techniques, la technique de transfert d'énergie par résonance de Förster (Förster Resonance Energy Transfer : FRET) semble la plus prometteuse. La technique du FRET est basée sur la mesure de l'énergie transférée entre un fluorochrome donneur et un fluorochrome accepteur proches, séparés d'une distance entre 1 et 10 nm (Castro et al., 2013, Jares-Erijman and Jovin, 2003). On distingue l'hétéro-FRET (transfert d'énergie entre deux molécules différentes) et l'homo-FRET (transfert d'énergie entre deux mêmes molécules). Le FRET est alors mesuré en regardant l'anisotropie de la fluorescence, c'est-à-dire la différence de polarisation entre l'émission de deux fluorophores. Cette technique a été utilisée afin d'identifier le type et le nombre de molécules présentes dans un radeau lipidique (Bader et al., 2009). Dans cette étude, les chercheurs ont réussi à mettre en évidence le fait qu'il existait des regroupements (« clusters ») dans la membrane plasmique, et notamment le regroupement de récepteurs à l'EGF observé lors d'une stimulation avec de l'EGF. Cette technique est donc appréciée pour étudier l'organisation de la membrane plasmique.

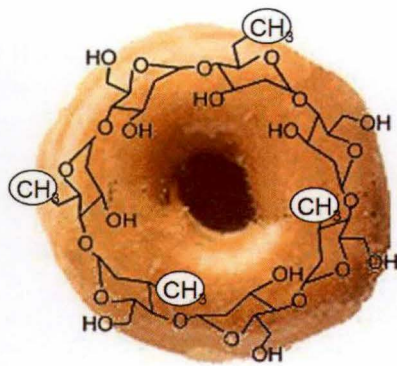
#### 1.2.3.2. Etude des radeaux lipidiques par manipulation de leurs constituants

Les radeaux lipidiques étant constitués en grande partie de cholestérol, on peut étudier leur fonction en perturbant leur contenu en cholestérol. De nombreuses méthodes existent pour perturber le cholestérol présent dans les membranes et donc au sein des radeaux lipidiques (Castro et al., 2013).

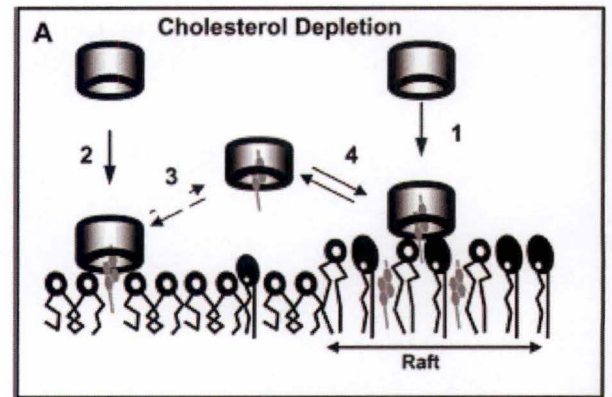
##### 1.2.3.2.1. Séquestration du cholestérol

Premièrement, le cholestérol peut être séquestré grâce à des agents chimiques tels que des antibiotiques de la famille des macrolides polyènes (Castro et al., 2013). Les macrolides ont la particularité d'être des antibiotiques utilisés pour les infections intracellulaires puisqu'ils peuvent entrer à l'intérieur des cellules. Dans cette famille, on retrouve des composés tels que la nystatine, l'amphotéricine ou encore la filipine (Castro et al., 2013, Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). Cette dernière a besoin d'un groupement hydroxyle libre en extrémité 3' de la molécule cible, ce qui fait du cholestérol une cible idéale. La filipine exerce son action en se liant aux stérols de la membrane plasmique, perturbant cette dernière et formant des pores (**Figure 9**) (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). Etant fluorescente, son utilisation permet de localiser le cholestérol cellulaire. La technique est utilisée depuis de nombreuses années et

A



B



**Figure 10: Représentation schématique de la déplétion du cholestérol membranaire par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD).** **A.** La M $\beta$ CD est un heptamère cyclique de D-glucopyranoses méthylés. Sa forme est souvent comparée à celle d'un donut (Mathay C., 2010). **B.** Mécanisme d'action de la M $\beta$ CD sur les membranes cellulaires. Sa forme cyclique lui permet de séquestrer le cholestérol en son centre, déplaçant ainsi celui-ci de la membrane plasmique (D'après Zidovetzki and Levitan, 2007).



dans différents types cellulaires, notamment chez les fibroblastes (Porn and Slotte, 1995). Les deux autres macrolides, la nystatine et l'amphotéricine, ont les mêmes propriétés que la filipine, et forment également des pores dans la membrane plasmique (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007).

#### *1.2.3.2.2. Traitement avec des statines*

Les statines sont bien connues pour avoir révolutionné les traitements mis en place contre les maladies cardiovasculaires en limitant la cholestérolémie. En effet, ce sont des molécules qui sont capables d'inhiber la biosynthèse du cholestérol par inhibition d'une enzyme clé dans cette voie de synthèse, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA réductase (HMG-CoA réductase) (Stancu and Sima, 2001). Cette enzyme est responsable de la conversion de l'HMG-CoA en acide mévalonique. Parmi les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol, on peut citer la lovastatine, qui a été utilisée dans des expériences d'inhibition de synthèse du cholestérol chez les kératinocytes, avec ou sans traitement avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (Jans et al., 2004).

#### *1.2.3.2.3. Utilisation de cholestérol oxydase*

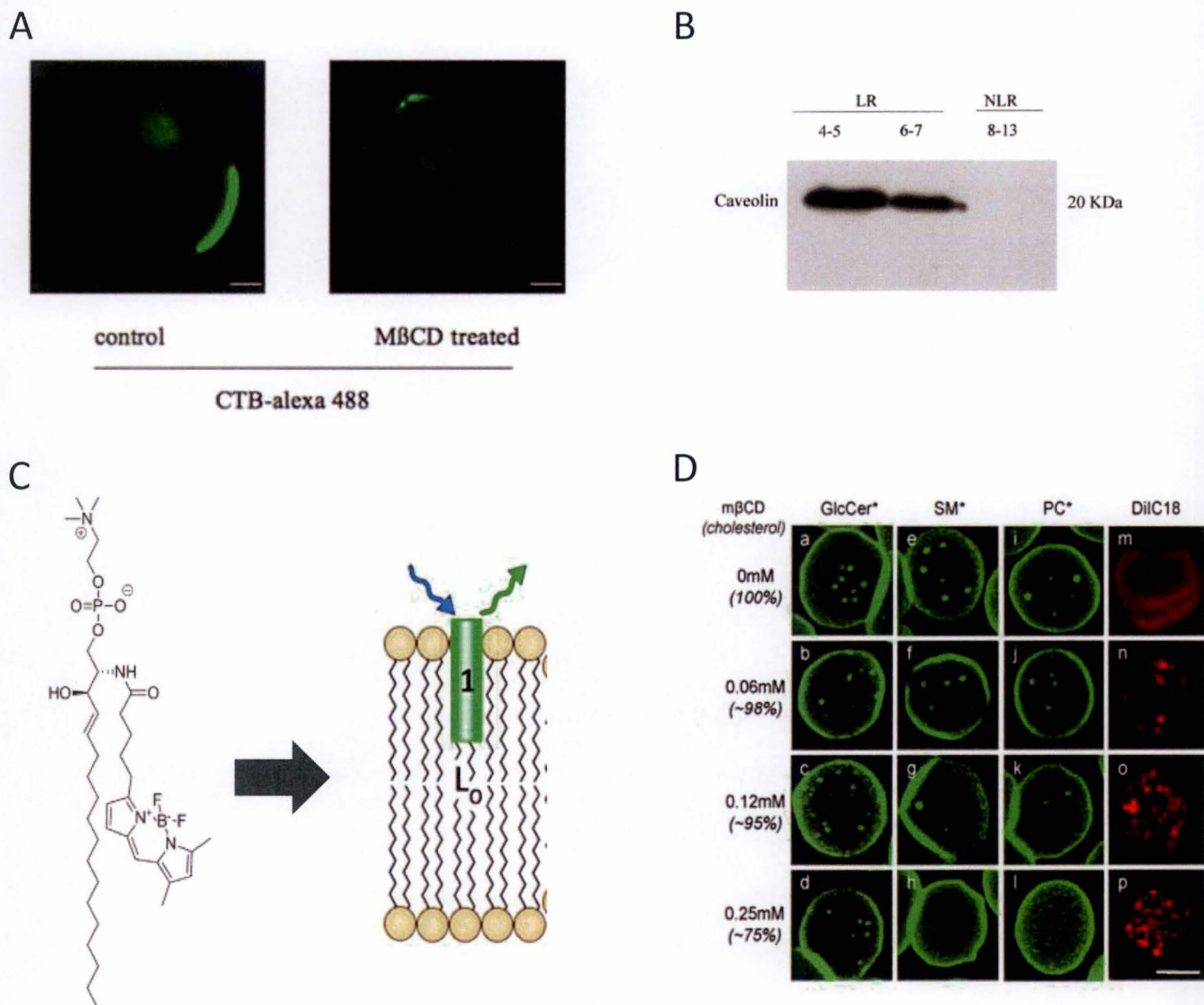
La cholestérol oxydase est une enzyme naturellement présente dans l'organisme dont le rôle est de catalyser la transformation du cholestérol en cholest-4-en-3-one, avec formation de peroxyde d'hydrogène. Cette caractéristique permet son identification grâce à la peroxydase afin de former un substrat chromogène ou fluorescent (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). La transformation du cholestérol en cholest-4-en-3-one rend ses propriétés en membrane différentes, ce qui en fait un élément capable de perturber les radeaux lipidiques (Castro et al., 2009).

#### *1.2.3.2.4. Cytolysines dépendantes du cholestérol*

Les cytolysines dépendantes du cholestérol sont des toxines sécrétées par certaines bactéries gram positives qui se lient à la membrane de la cellule cible, s'oligomérisent et forment des pores dans la membrane plasmique de la cellule. La présence de cholestérol en membrane est nécessaire pour permettre la formation des pores (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). Plusieurs types de bactéries sont capables de produire cet effet sur la membrane plasmique : *Streptococcus pyogenes* (streptolysine O), *Streptococcus pneumoniae* (pneumolysine), *Listeria monocytogenes* (listeriolysine O), *Clostridium perfringens* (perfringolysine O) et *Bacillus anthracis* (anthrolysine). Parmi celles-ci, la perfringolysine O, aussi appelée toxine- $\theta$ , est utilisée pour détecter le cholestérol membranaire, notamment via l'utilisation d'une forme clivée et biotinylée de la toxine n'engendrant plus de lésions membranaires (Iwamoto et al., 1997).

#### *1.2.3.2.5. Utilisation de cyclodextrines*

Les cyclodextrines sont des molécules d'oligosaccharides cycliques, formées de sous-unités de D-glucopyranose liés entre eux grâce à des liaisons de type  $\alpha$ 1-4 (Zidovetzki and Levitan, 2007). Il existe trois sous-types de cyclodextrines, classées en fonction du nombre de sous-



**Figure 11: Marqueurs de radeaux lipidiques.** **A.** Marquage du ganglioside GM1 dans des globules rouges grâce à la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome de type Alexa (D'après Lingwood et al., 2008). **B.** Détection de la cavéoline en western blot dans des cellules sino-auriculaires de lapin. Les différentes fractions membranaires sont séparées grâce à une centrifugation sur gradient de saccharose. La détection de la cavéoline se fait dans les fractions correspondants aux radeaux lipidiques (LR) mais pas dans les autres fractions (NLR) (D'après Barbuti et al., 2004). **C.** Représentation schématique d'une molécule de bore-dipyrométhène analogue de la sphingomyéline (BODIPY-SM) et de son mode d'action. Le BODIPY-SM s'insère dans la membrane plasmique et sa détection est possible grâce au fluorophore qu'il contient (D'après Klymchenko and Kreder, 2014). **D.** Détection des lipides associés aux radeaux lipidiques (Glucosyl céramide, sphingomyéline et phosphatidylcholine et lipides membranaires en général) dans des globules rouges grâce à des sondes de type BODIPY couplées à des analogues de ces lipides (D'après D'auria et al., 2013).



unités qu'elles possèdent : les  $\alpha$ -cyclodextrines possèdent 6 sous-unités, les  $\beta$ -cyclodextrines possèdent 7 sous-unités et les  $\gamma$ -cyclodextrines possèdent 8 sous-unités (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007, Zidovetzki and Levitan, 2007). La particularité de ces molécules est qu'elles sont cycliques et forment une sorte de cavité dans laquelle elles sont capables d'enfermer des molécules hydrophobes. Les cyclodextrines de type  $\beta$  sont capables de séquestrer plus spécifiquement le cholestérol en l'emprisonnant dans leur cavité, propriété rendue possible grâce à la taille de leur cavité (ce qui n'est pas le cas des cyclodextrines de type  $\alpha$ ) et à l'hydrophobicité de celle-ci (ce qui n'est pas le cas des cyclodextrines de type  $\gamma$ ). La solubilité dans l'eau des cyclodextrines  $\beta$  peut être améliorée en modifiant quelque peu la molécule, par exemple en ajoutant des groupements hydroxyles, ce qui crée la molécule de 2-hydroxyl- $\beta$ -cyclodextrine (2OH $\beta$ CD) ou en ajoutant des groupements méthyls, ce qui génère la molécule de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007, Zidovetzki and Levitan, 2007).

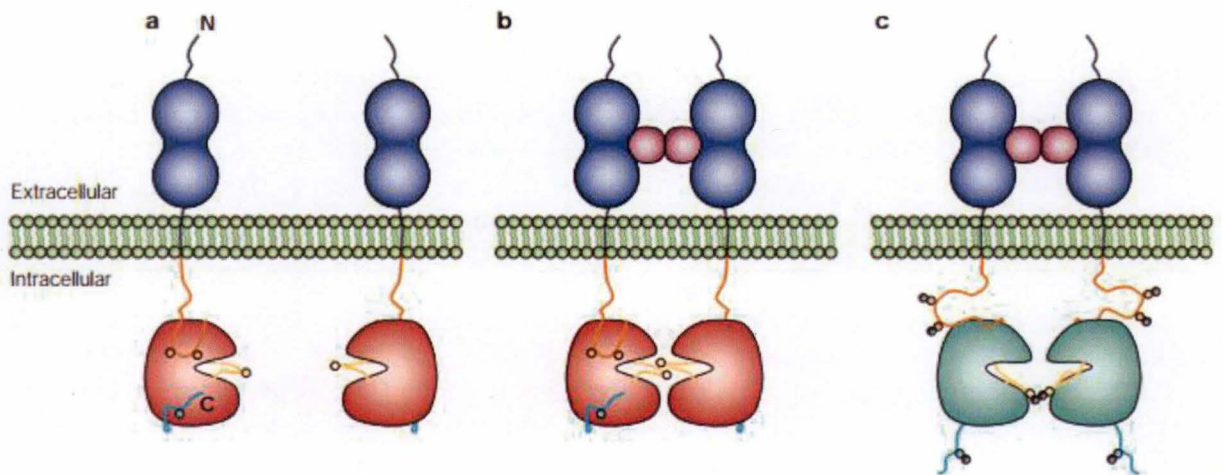
La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine est la plus efficace dans le cadre d'une déplétion du cholestérol membranaire (Castro et al., 2013, Gimpl and Gehrig-Burger, 2007, Zidovetzki and Levitan, 2007). Il s'agit d'une molécule composée de 7 sous-unités de D-glucopyranose méthylées et reliées entre elles par des liaisons de type  $\alpha 1-4$ . On la compare souvent à un « donut » à cause de sa forme cyclique (**Figure 10 A**). Elle est donc capable, de par sa forme cyclique, de capturer le cholestérol membranaire en son centre, le déplaçant ainsi de la membrane plasmique (**Figure 10 B**). Des tests d'efficacité de cette molécule ont démontré qu'elle était capable de retirer jusqu'à 80 % du cholestérol membranaire en 30 minutes d'exposition dans des fibroblastes (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). Cette molécule a déjà été largement utilisée pour étudier le rôle des radeaux lipidiques dans certaines cellules, et notamment chez les kératinocytes (Calay et al., 2010, Jans et al., 2004, Lambert et al., 2008, Lambert et al., 2010, Lambert et al., 2006, Mathay et al., 2008, Mathay et al., 2011, Mathay and Poumay, 2010).

#### 1.2.3.3. Marqueurs des radeaux lipidiques

Les constituants des radeaux lipidiques étant mieux connus à l'heure actuelle, il est possible de les étudier en marquant leurs composants. Parmi ces méthodes, on peut citer la toxine cholérique de type B. En effet, cette dernière est capable de se lier aux gangliosides de type GM1 présents dans les radeaux lipidiques. En couplant la toxine à un fluorochrome, on peut détecter les GM1 en microscopie confocale (Castro et al., 2013, Harder et al., 1998, Lingwood et al., 2008) (**Figure 11 A**).

Il existe également des méthodes de détection basées sur le marquage des composants des radeaux lipidiques comme la cavéoline-1 et la flotiline-1, deux protéines associées à ces radeaux lipidiques (Barbuti et al., 2004) et qui peuvent être détectées par la technique de Western blotting par exemple, après avoir isolé les radeaux lipidiques grâce à une séparation isopycnique sur gradient de saccharose (**Figure 11 B**).

Une autre méthode utilise le marquage des cellules avec des sondes analogues de lipides membranaires tels que la sphingomyéline, les glycosphingolipides ou encore la phosphatidylcholine, couplés au fluorochrome de type bore-dipyrométhène (BODIPY), un fluorophore lipophile (**Figure 11 C**) (D'Auria et al., 2013). Ces analogues peuvent être utilisés comme des traceurs de ces lipides en membrane et ont notamment permis de suivre la localisation d'un type de lipide précis dans des globules rouges après une perturbation des radeaux lipidiques via une déplétion du cholestérol (**Figure 11 D**) (D'Auria et al., 2013).



**Figure 12: Représentation schématique de l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase.** Quand le ligand sous forme dimérique ou deux ligands sous forme monomérique se lient simultanément à deux récepteurs à activité tyrosine kinase, cela induit leur dimérisation et leur activation via la phosphorylation de plusieurs tyrosines du domaine à activité tyrosine kinase. Cela aura pour effet de recruter des protéines cytoplasmiques et de les phosphoryler provoquant l'activation des voies de signalisation (D'après Hubbard, 2004).



Malgré le fait que les techniques pour étudier les radeaux lipidiques se soient développées au cours des dernières années, il est encore difficile d'attribuer une définition précise au concept des radeaux lipidiques car leur étude se fait de manière indirecte, après un stimulus particulier par exemple. Tout au long de ce mémoire, nous attribuerons la définition de radeaux lipidiques aux domaines membranaires riches en cholestérol, dont le retrait perturbe les radeaux lipidiques.

#### **1.2.4. Rôles**

Vu la difficulté d'identifier clairement ces radeaux lipidiques dans une cellule, leurs rôles précis restent encore incertains. Cependant, certains rôles sont maintenant correctement identifiés. Parmi ceux-ci, on peut citer le rôle qu'ils jouent dans l'infection des cellules par les virus, et plus particulièrement lors du bourgeonnement du virus dans la cellule animale. En effet, certains virus vont bourgeonner à partir de la cellule-hôte (Simons and Gerl, 2010) et ainsi se constituer une membrane faite de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ainsi, des chercheurs ont réussi à mettre en évidence la présence de radeaux lipidiques dans les enveloppes du virus de l'influenza (Scheiffele et al., 1999). Les radeaux lipidiques semblent également avoir un rôle dans le cycle réplcatif du virus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV-1), que ce soit lors de son entrée dans la cellule par bourgeonnement avec la membrane plasmique, ou lors de son assemblage qui semble requérir la présence de sphingolipides et de cholestérol (Waheed and Freed, 2009).

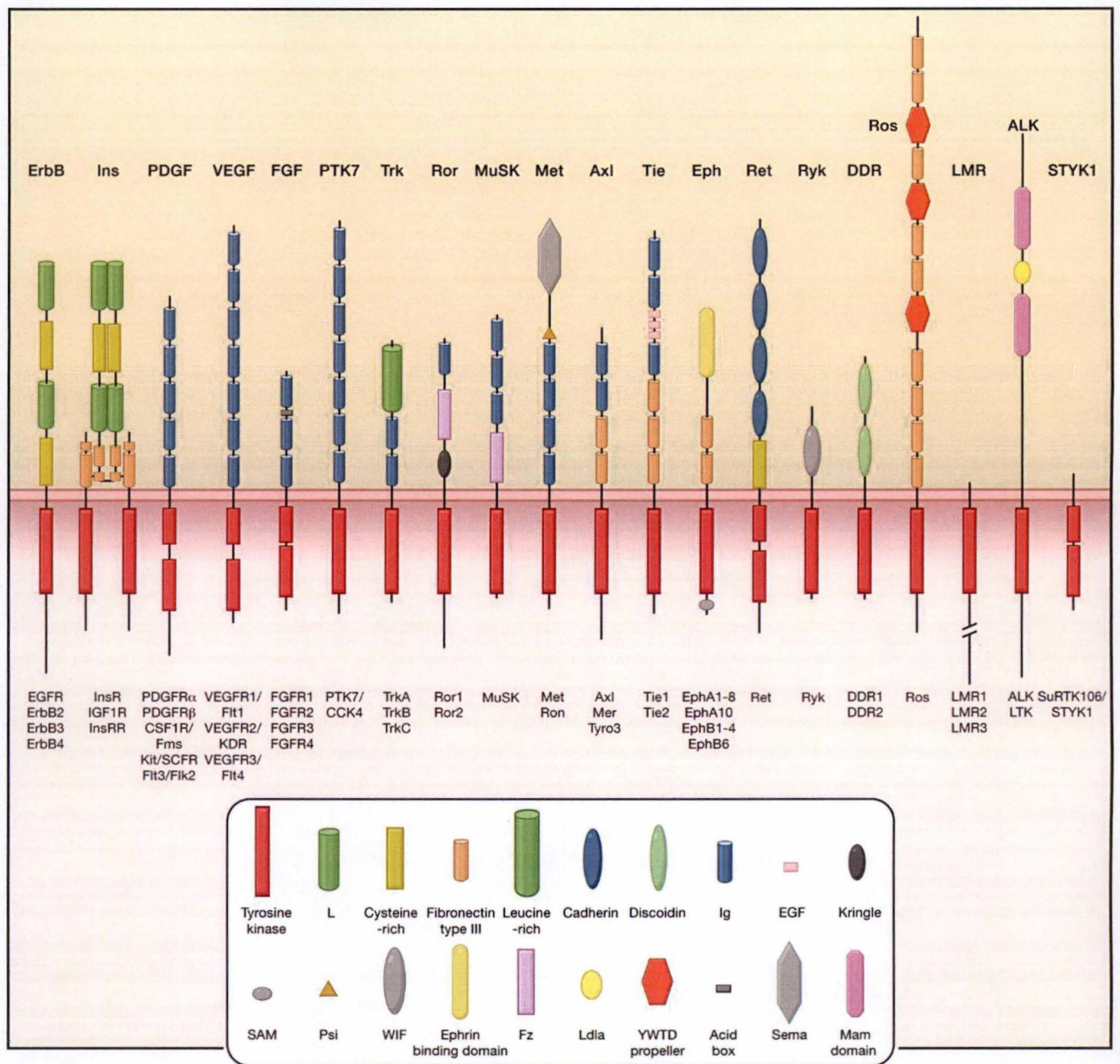
Les radeaux lipidiques semblent également avoir un rôle dans la signalisation des lymphocytes T. En effet, ils semblent se regrouper afin de condenser les récepteurs des cellules T (TCR) en un seul endroit afin de faciliter l'activation des cellules par le contact avec un antigène (Simons and Gerl, 2010).

Enfin, le dernier rôle des radeaux lipidiques, et non des moindres, est celui de la fonction qu'ils auraient dans la signalisation cellulaire. En effet, ils seraient capables de former des regroupements rapides des protéines responsables de la signalisation cellulaire et ainsi de favoriser une réponse plus adaptée au stimulus (Simons and Gerl, 2010). Cette hypothèse de fonction dans la signalisation cellulaire est renforcée par le fait que les radeaux lipidiques sont capables de former des vésicules (cavéoles), composées également de protéines de la signalisation, afin de diminuer le temps de réponse de la cellule (Simons and Sampaio, 2011).

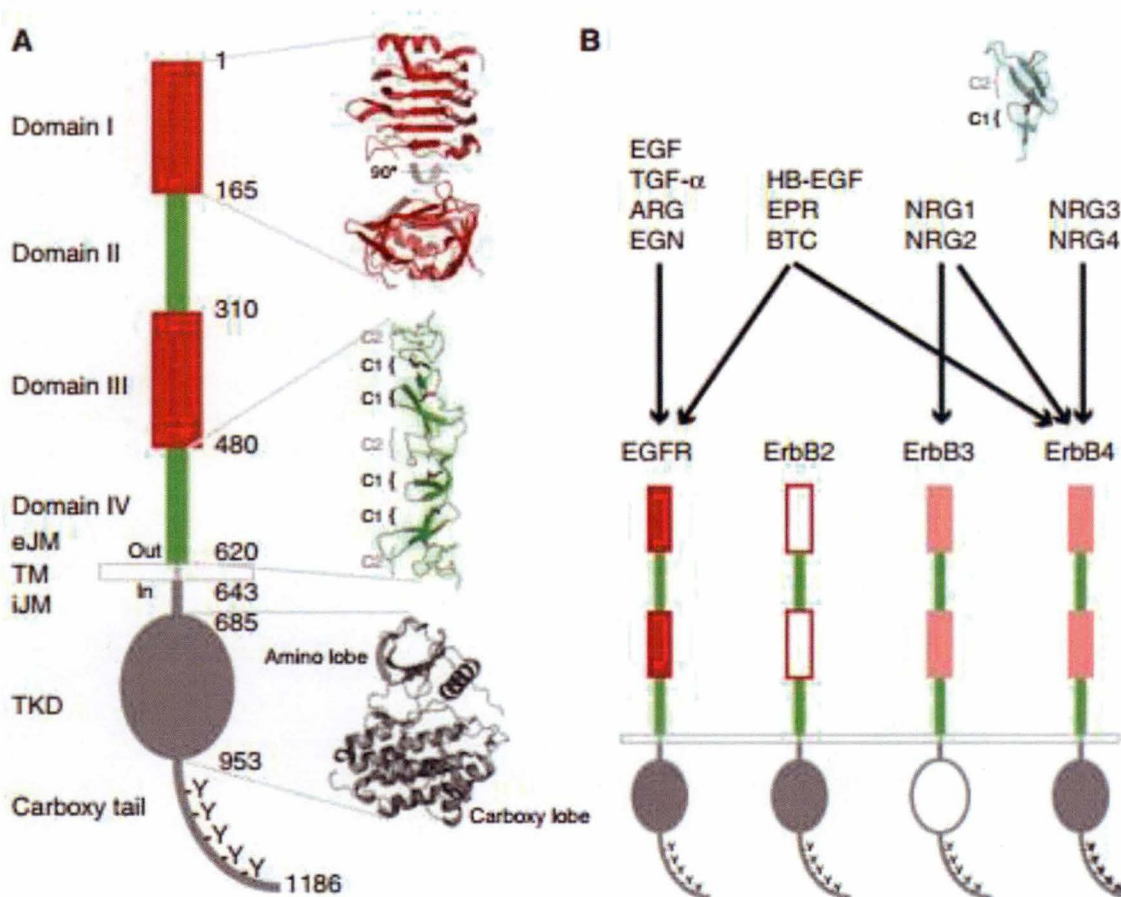
### **1.3. Les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont une famille de récepteurs dont la structure se compose d'une région extracellulaire correspondant au domaine de liaison au ligand, une région transmembranaire et une région cytoplasmique comprenant un domaine à activité tyrosine kinase et une extrémité carboxy-terminale (Lemmon and Schlessinger, 2010). La particularité de ces récepteurs est que, pour la plupart, l'activation par le ligand nécessite une étape de dimérisation du récepteur induite par le ligand lui-même (**Figure 12**). Il existe des variations dans le processus de dimérisation en fonction type de récepteur concerné (Ullrich and Schlessinger, 1990). De manière générale, le ligand, qui est bivalent, se fixe sur les deux récepteurs en même temps, induisant leur dimérisation. S'en suit une





**Figure 13: Famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).** Représentation schématique des 20 familles de RTK. Les familles sont classées en fonction de la structure de leur récepteur. Les membres des différentes familles sont cités en bas de l'image (D'après Lemmon and Schlessinger, 2010).



**Figure 14: Représentation schématique des récepteurs de la famille ErbB.** **A.** Représentation du récepteur à l'EGF : la partie extracellulaire est composée de 4 domaines dont les domaines I et III sont relativement proches en séquence et les domaines II et IV ont une séquence proche également et sont riches en cystéines. S'en suit un court domaine transmembranaire et enfin le domaine intracellulaire composé d'un domaine à activité tyrosine kinase suivi d'une queue carboxy-terminale cytoplasmique contenant les nombreuses tyrosines pouvant être phosphorylées. **B.** Représentation des 4 membres de la famille ErbB et de leurs ligands. ErbB2 ne semble pas avoir de ligand connu et ErbB3 ne semble pas avoir de domaine à activité tyrosine kinase actif (D'après Lemmon and Schlessinger, 2014).



phosphorylation des tyrosines présentes dans le domaine à activité tyrosine kinase, ce qui augmente leur activité enzymatique. Cela va avoir pour résultante la phosphorylation de nombreuses protéines de la signalisation, elles-mêmes pouvant alors interagir avec des protéines en aval. Au final, la résultante de l'activation du récepteur est une activation de la transcription de certains gènes. Les gènes activés dépendent bien entendu du récepteur activé, mais de manière générale, les RTK sont responsables de la transcription de gènes impliqués dans des processus tels que la croissance, la prolifération, la survie ou encore la différenciation (Lemmon and Schlessinger, 2010, Ullrich and Schlessinger, 1990).

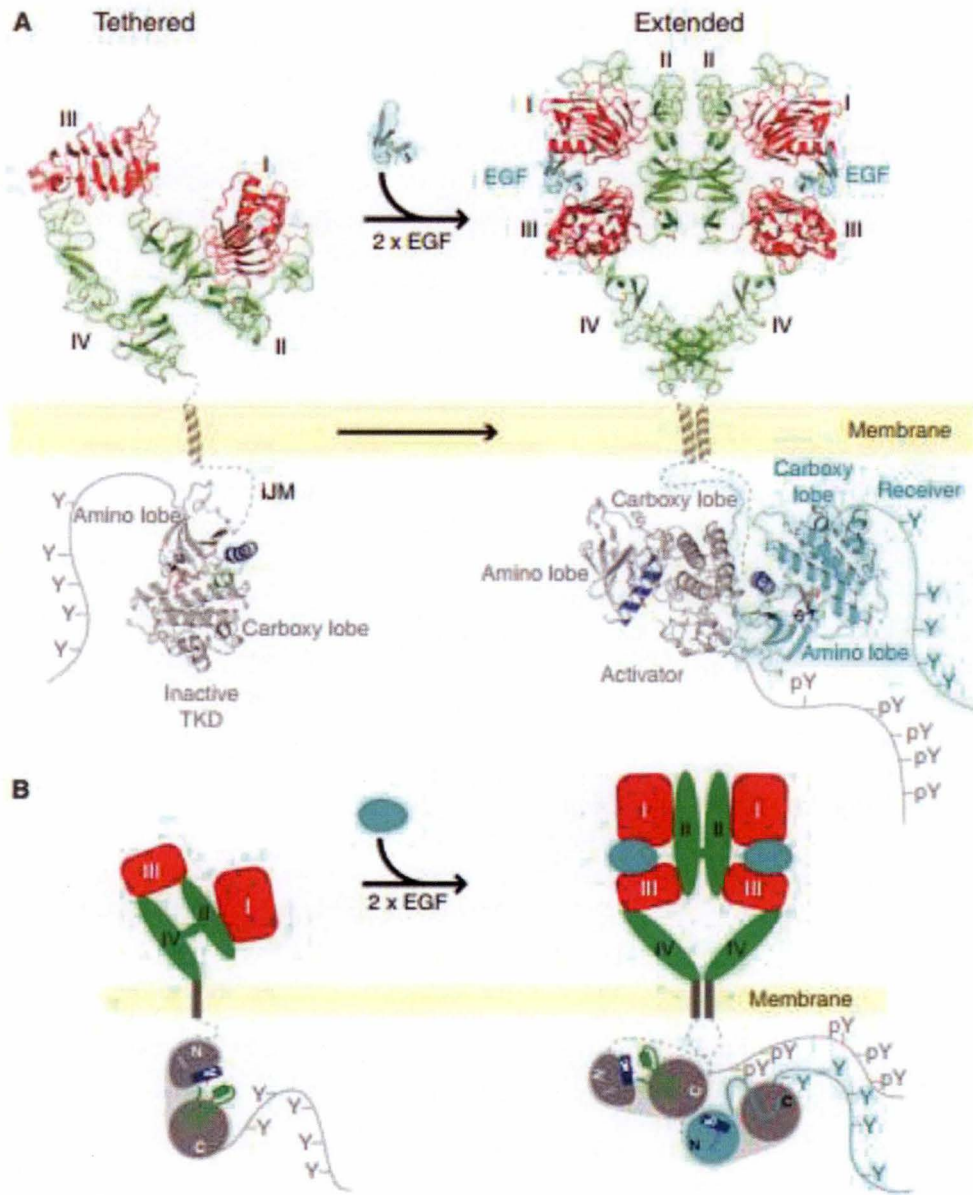
L'intérêt porté aux récepteurs à activité tyrosine kinase s'est amplifié au cours des dernières années puisqu'ils sont impliqués dans un grand nombre de pathologies et notamment les cancers (Lemmon and Schlessinger, 2010). Certains de ces récepteurs, ou bien certaines protéines dépendantes de leur activation, sont en effet nommés oncogènes car leur expression est typiquement modifiée dans certains cancers (Lin et al., 2000). Ces tyrosines kinases deviennent des oncogènes à cause d'altérations génétiques. Il s'agit translocations, de surexpressions, de mutations de type SNP (Single Nucleotid Polymorphism) ou encore de tronctions de protéines, mais toutes vont avoir le même effet au final : une activation incontrôlée du récepteur tyrosine kinase et l'activation des voies de signalisation qui en découlent (Skorski, 2002). Depuis lors, plusieurs thérapies anti-cancéreuses ciblent des récepteurs à activité tyrosine kinase (Knight et al., 2010).

A l'heure actuelle, on recense une cinquantaine de récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont eux-mêmes regroupés en une vingtaine de familles déterminées en fonction de la structure des récepteurs (Lemmon and Schlessinger, 2010) (**Figure 13**). Parmi ceux-ci, le récepteur à l'EGF (EGF-R, Epidermal Growth Factor Receptor) nous intéresse particulièrement car il a déjà été étudié en association avec les radeaux lipidiques chez les kératinocytes (Lambert et al., 2008, Lambert et al., 2010, Lambert et al., 2006).

### **1.3.1. La voie dépendante de l'EGF-R**

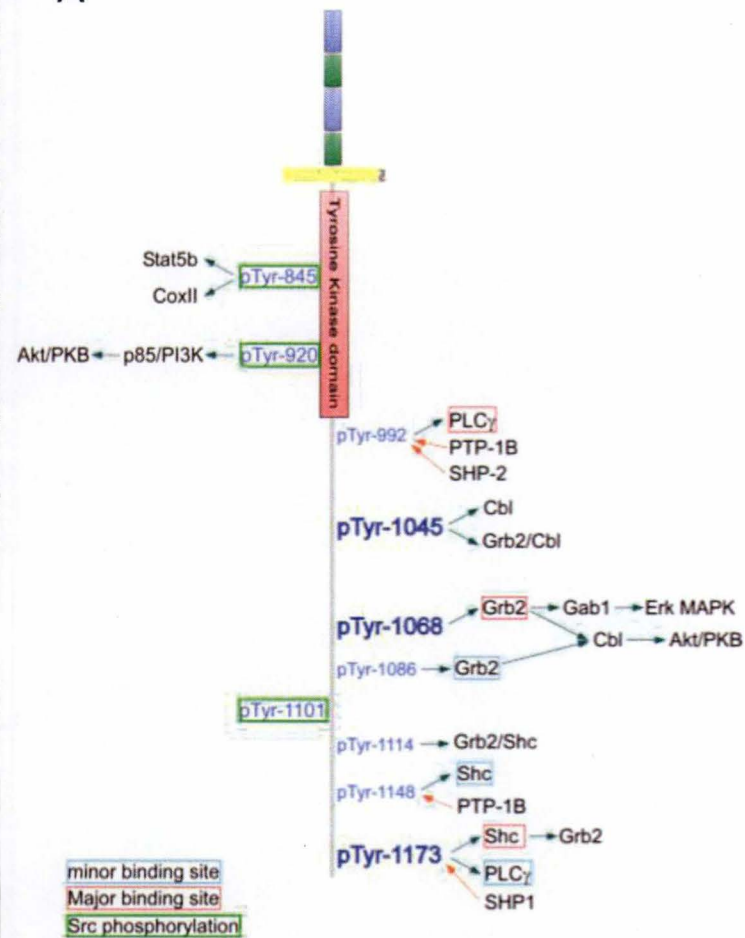
Le récepteur à l'EGF est un des plus importants dans les cellules de mammifères en termes de régulation de la prolifération, de la survie, de la croissance et de la différenciation cellulaire (Oda et al., 2005). De plus, ce fut le premier récepteur à activité tyrosine kinase découvert (Carpenter and Cohen, 1978). Le récepteur à l'EGF est le premier membre de la famille ErbB, composée de quatre membres (EGF-R, ErbB2, ErbB3, ErbB4). Ils ont tous la même structure de base : un domaine extracellulaire, composé de quatre domaines (I-IV) capables de lier le ligand, un petit domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique composé d'un domaine à activité tyrosine kinase. Leur différence se situe au niveau du ligand qu'ils sont capables de reconnaître (Lemmon and Schlessinger, 2010). L'EGF-R possède plusieurs ligands potentiels, dont l'EGF est le plus connu. Mais l'EGF-R est également capable de se dimériser suite à la liaison d'autres ligands tels que l'amphiréguline, le TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), l'épigène (Schneider, 2014), l'HB-EGF (Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor), la bétacelluline et l'épiréguline. Les trois derniers sont également capables de se lier à l'ErbB4. Le récepteur ErbB2 ne semble pas avoir de ligand connu à l'heure actuelle, le récepteur ErbB3 est activé par les neurégulines 1 et 2 (NRG 1 et NRG2) mais son domaine à activité tyrosine kinase semble être inactif et enfin le récepteur ErbB4 est activé par les neurégulines 3 et 4 (NRG3 et NRG4) en plus des ligands cités plus haut (**Figures 14 A et 14 B**).



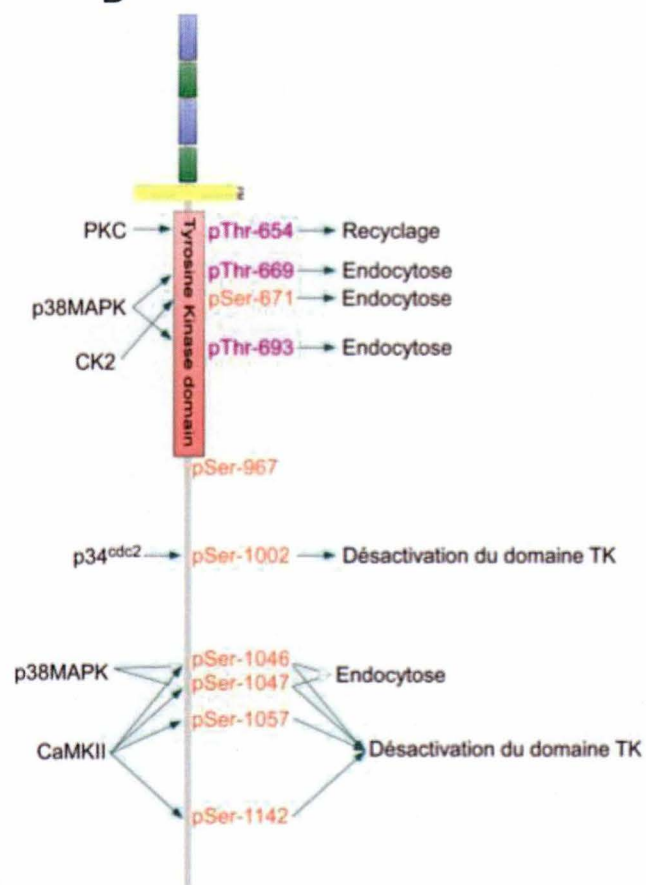


**Figure 15: Modèles d'activation ligand-dépendante de l'EGF-R.** **A.** Quand le récepteur est inactif, il est sous forme monomérique. Pour l'activer, il faut que deux récepteurs entrent en contact avec deux molécules d'EGF. Cela aura pour effet d'entraîner un changement de conformation dans la portion extracellulaire du récepteur, la dimérisant. La portion cytoplasmique se dimérise également et le domaine tyrosine kinase va alors s'activer, phosphorylant les tyrosines présentes sur son extrémité carboxy-terminale. Ces tyrosines phosphorylées sont alors susceptibles de lier diverses protéines de la signalisation cellulaire. **B.** Représentation simplifiée des étapes expliquées au point A (D'après Lemmon and Schlessinger, 2014).

A

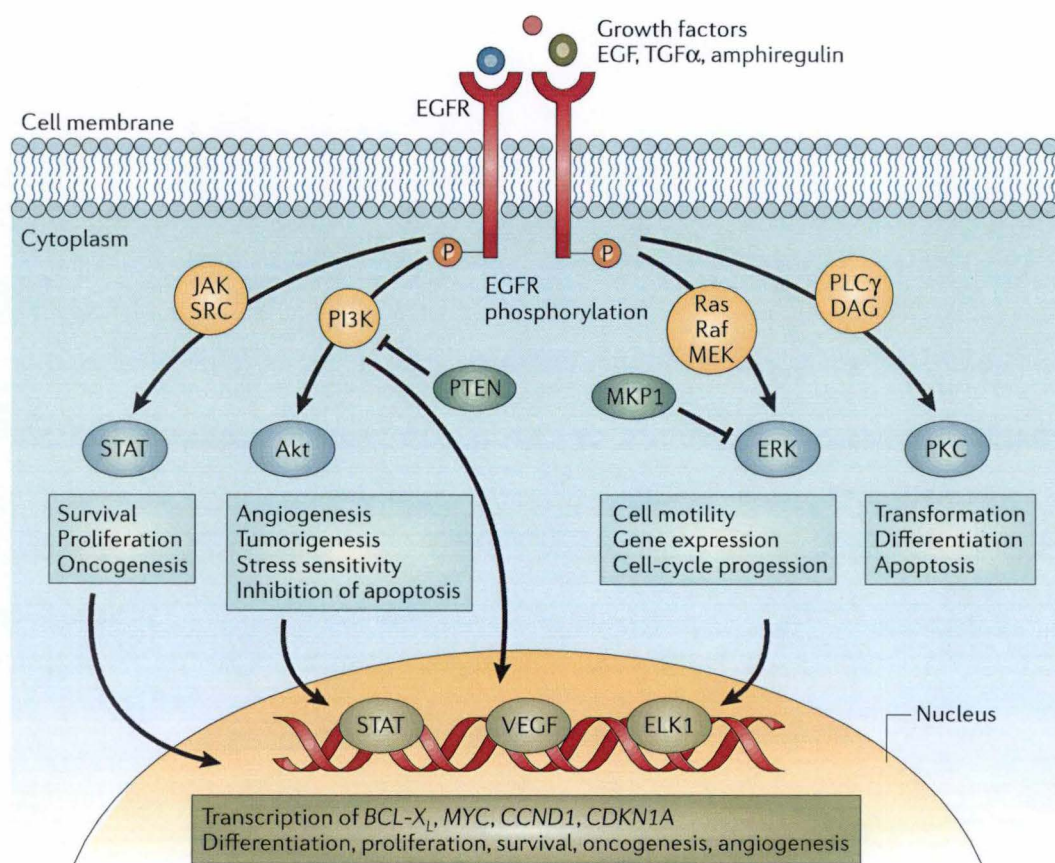


B



**Figure 16: Représentation schématique des domaines de phosphorylation de l'EGF-R et des protéines associées. A.** Représentation schématique des tyrosines activées sur l'EGF-R. **B.** Représentation schématique des sérines et des thréonines activées sur l'EGF-R (Lambert S., 2009).





**Figure 17: Schéma représentant les principales voies de signalisation activées par l'EGF et l'EGF-R.** Quatre voies principales sont activées suite à la liaison de l'EGF sur l'EGF-R : (1) JAK/STAT (Janus kinase/Transducers and Activators of Transcription) ; (2) PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/thymoma viral proto-oncogene) ; (3) Ras/MAPK (Ras/Mitogen-activated protein kinase) ; (4) PLC $\gamma$ /DAG (Phospholipase C/ Diacylglycérol). Ces voies mènent à l'activation de gènes responsables de la survie, de la croissance et de la différenciation cellulaire (D'après Nyati et al., 2006).

### 1.3.1.1. Structure et activation du récepteur

Le gène codant le récepteur à l'EGF est situé sur le chromosome 7. Ce gène code pour une protéine d'une taille de 1186 acides aminés, qui est l'EGF-R. Le récepteur est composé d'une partie extracellulaire de 622 acides aminés, elle-même composée de quatre domaines : les domaines I et III sont composés respectivement de 165 et 170 acides aminés et possèdent une séquence assez similaire, les domaines II et IV sont composés respectivement de 145 et 140 acides aminés, sont relativement proches en terme de séquence également et sont riches en cystéines. Ensuite suit un petit domaine transmembranaire, composé de 23 acides aminés. Enfin, vient le domaine intracellulaire, composé de 542 acides aminés, pouvant être lui-même décomposé en trois parties distinctes : la région juxta-membranaire, suivie par le domaine à activité tyrosine kinase et enfin la queue carboxy-terminale, comprenant cinq motifs d'auto-phosphorylation (Lemmon and Schlessinger, 2010, Wells, 1999) (**Figure 14 A**).

Quand l'EGF n'est pas lié au récepteur, ce dernier est sous forme monomérique et le domaine extracellulaire exerce une auto-inhibition grâce aux interactions entre le domaine II et le domaine IV, prenant une conformation repliée. Il faut deux molécules d'EGF afin d'activer le récepteur. L'EGF se lie aux domaines I et III de la portion extracellulaire du récepteur. Cette liaison entraîne un changement de conformation de la portion extracellulaire du récepteur, cette dernière s'y dimérisant. Cela va avoir pour effet d'entraîner un rapprochement des domaines à activité tyrosine kinase dans le cytosol, menant ensuite à leur dimérisation et à l'activation de l'activité kinase de cette portion du récepteur (**Figure 15**). Cette activation entraîne alors une phosphorylation des tyrosines présentes dans la queue N-terminale, elles-mêmes pouvant alors recruter des protéines adaptatrices ou des enzymes et activer différentes voies de signalisation. Parmi les protéines adaptatrices on peut citer :

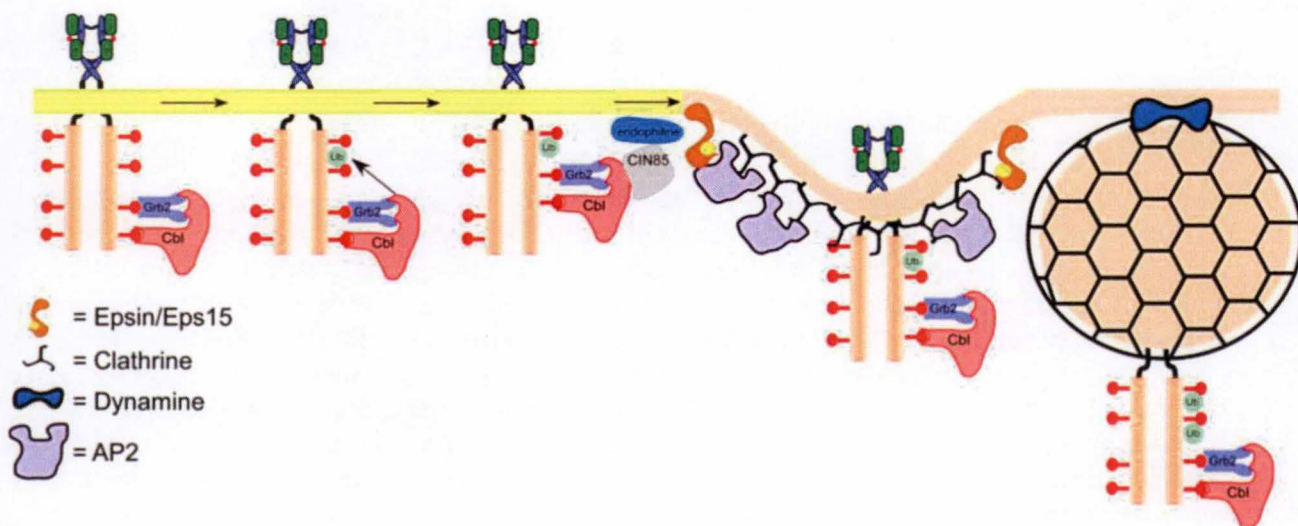
- Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound protein 2) : composée de deux domaines SH3 (Src Homology 3) et d'un domaine SH2 (Src Homology 2). Ce dernier permet la liaison avec le récepteur à l'EGF. Grb2 pourra alors interagir avec SOS (Son Of Sevenless) via son domaine SH3 et ainsi activer les voies dépendantes du facteur Ras (Rat sarcoma virus oncogen). Cette protéine adaptatrice est également responsable du recrutement de la protéine Cbl, menant à la dégradation de l'EGF-R (Tomas et al., 2014).
- Shc (Src Homology 2 domains Containing) : composée d'un domaine SH2 et un domaine PTB (Phosphotyrosine binding domain), elle va interagir avec Grb2 et par là, interagir avec Ras (Ravichandran, 2001).

Chaque tyrosine phosphorylée peut lier une protéine précise et ainsi activer certaines voies de transduction du signal (**Figure 16 A**). Le récepteur possède également des résidus thréonine et sérine qui peuvent également être phosphorylés suite à l'activation du récepteur (**Figure 16 B**).

### 1.3.1.2. Voies de signalisation activées

Les voies activées par le récepteur à l'EGF sont nombreuses et complexes (**Figure 17**). Il y a à ce jour 208 molécules recensées participant à la signalisation de l'EGF-R chez l'homme. Parmi elles, on distingue 187 protéines, 18 composés chimiques et 3 transcrits (selon [www.reactome.org](http://www.reactome.org)). L'activation du récepteur à l'EGF est responsable de l'activation de quatre grandes voies de signalisation cellulaire :





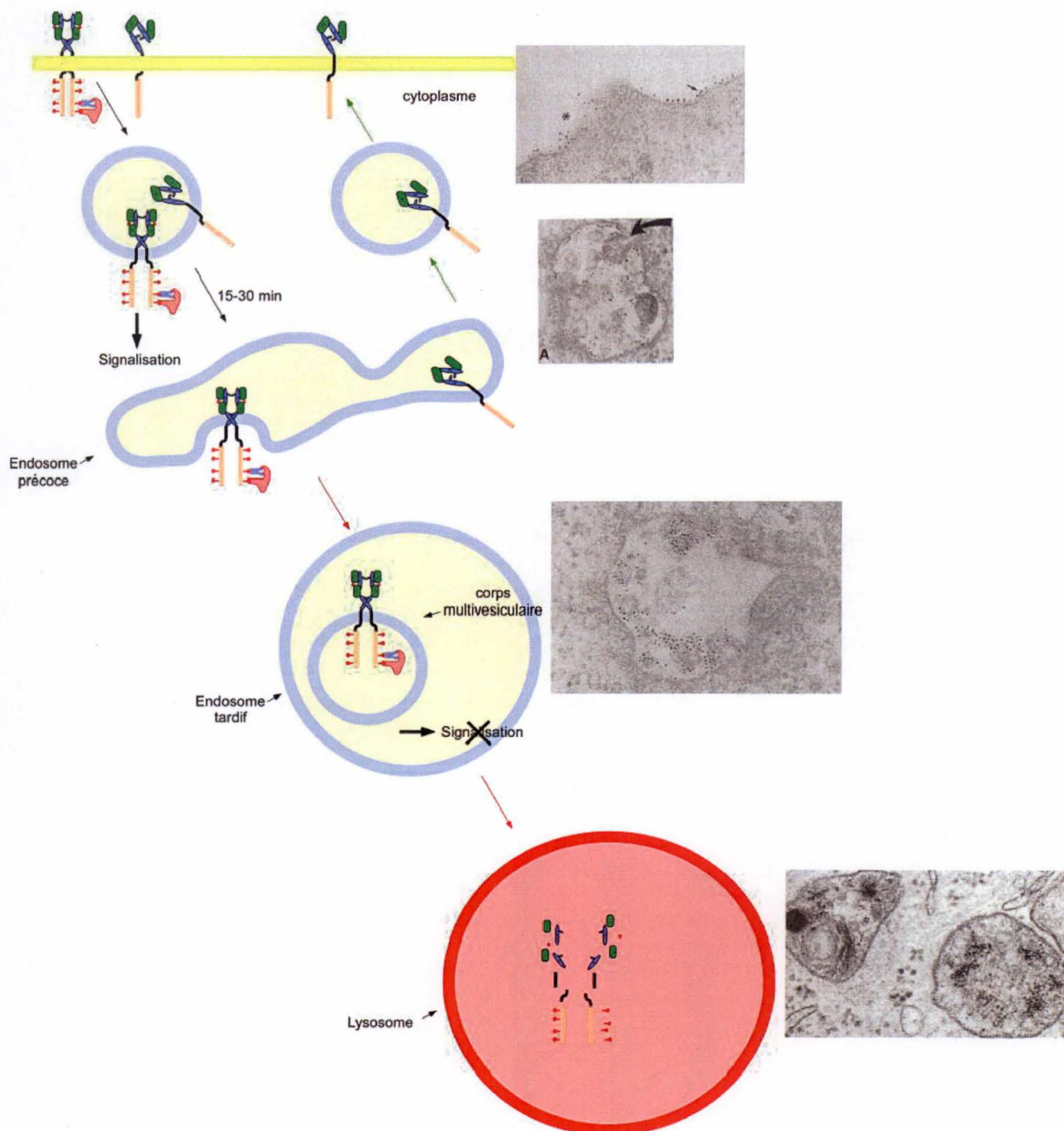
**Figure 18: Représentation schématique du processus d'endocytose médiée par la clathrine.** L'EGF-R activé recrute la protéine adaptatrice Grb2 qui elle-même recrute la protéine Cbl, une ubiquitine ligase de type E3. Un processus d'ubiquitinylation est alors mis en place et est nécessaire à la formation de puits couverts de clathrine, qui endocytent alors l'EGF-R (Lambert S., 2009).

- **La voie Ras/MAPK** (Ras/Mitogen Activated Protein Kinase) : cette voie débute par le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 par les domaines SHC et SHP2 (Src Homology Phosphatase-1/2) du récepteur à l'EGF, suivi du recrutement de la protéine SOS qui elle-même pourra interagir avec la protéine Ras. Cette dernière est une GTPase (Guanosine-5'-triphosphatase) dont l'activation sous forme de GTP dépend de la protéine SOS. En effet, cette dernière est responsable de l'échange de GDP en GTP, ce qui active la protéine Ras. Il y aura ensuite recrutement de la protéine Raf, menant à l'activation de la voie des MAPK via la phosphorylation des protéines MEK (MAP kinase-Erk kinase) et ensuite des kinases Erk 1 et 2 (Extracellular Regulated MAP kinase 1 et 2). Cela mène à la transcription des gènes dépendants de ces voies, qui sont responsables de fonctions telles que la progression du cycle cellulaire, la croissance ou la différenciation cellulaire (Tidyman and Rauen, 2009).
- **La voie PI3K/Akt** (Phosphatidylinositol 3-kinase/Thymoma viral proto-oncogene): La PI3K est une protéine composée de deux sous-unités, p85, la sous-unité régulatrice, capable de se lier au domaine GAB1 (Grb2-associated binding protein 1) sur le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'EGF, et p110, la sous-unité catalytique. Le complexe phosphorylé est capable de convertir les PI(4,5)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) situées en membrane en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui vont alors pouvoir recruter le complexe PDK1 (Phosphoinositide-dependant protein kinase). Ce dernier est capable de recruter la protéine Akt, qui va alors exercer son action sur toute une série de protéines telles que Bad (Bcl2-antagonist of cell death) ou encore la procaspase 9 ainsi que sur des facteurs de transcription tels que la famille des FOXO (Forkhead). Le but est d'inhiber l'apoptose. C'est donc une voie de survie pour la cellule (Martini et al., 2014). La sous-unité mTORC2 (Mammalian Target of Rapamycin Complexe 2), faisant partie du complexe mTOR, est un activateur d'Akt, participant à la fonction de survie cellulaire. Il existe des régulateurs négatifs connus de cette voie tels que PTEN (Phosphatase and tensin homolog) qui va agir en inhibant la PI3K (Owonikoko and Khuri, 2013).
- **La voie PCL $\gamma$ /DAG** (Phospholipase C gamma/ Diacylglycérol) : La PLC est activée via le domaine SH2 et clive PI(4,5)P<sub>2</sub> en DAG et IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-triphosphate). Ce dernier agit au niveau du réticulum endoplasmique en libérant le calcium qu'il contient. Le DAG quant à lui va activer la PKC (Protéine Kinase C). Ces activations ont pour rôle la progression dans le cycle cellulaire et la différenciation cellulaire.
- **La voie JAK/STAT** (Janus kinase/Transducers and activators of transcription) : Les molécules JAK sont recrutées au niveau du récepteur à l'EGF et vont ensuite activer les protéines STAT. Elles sont ensuite transloquées jusqu'au noyau où elles activent des facteurs de transcription responsables de l'activation de gènes de survie, de prolifération ou encore d'oncogenèse (Quintas-Cardama and Verstovsek, 2013).

#### 1.3.1.3. Endocytose et dégradation

Il est important que l'EGF-R subisse une répression après avoir été activé. On peut distinguer deux mécanismes d'endocytose de l'EGF-R : l'endocytose médiée par la clathrine et l'endocytose indépendante de la clathrine.





**Figure 19: Représentation schématique et en microscopie électronique à transmission du trafic intracellulaire de l'EGF-R.** Suite à son activation, le récepteur est endocyté et subit un trafic vers les endosomes tardifs où il sera soit dégradé dans les lysosomes, soit recyclé vers la surface de la cellule (Lambert S., 2009).

- **Endocytose médiée par la clathrine :** elle se fait par l'intermédiaire de « puits recouverts de clathrine », un type d'endocytose majeure dans les cellules eucaryotes (Jackson et al., 2003). Ce type d'endocytose est médiée par la protéine adaptatrice Grb2, dont le domaine SH2 vient se lier sur les tyrosines phosphorylées 1068 et 1086 de l'EGF-R. La protéine Grb2 peut ensuite recruter Cbl (Casitas B-lineage lymphoma), une protéine capable d'agir comme une ubiquitine ligase de type E3. Cette dernière recrutera l'ubiquitine ligase de type E2 et favorisera l'ubiquitinylation de l'EGF-R. Cette étape d'ubiquitinylation semble nécessaire afin de former les puits recouverts de clathrine qui pourront ensuite endocyter l'EGF-R (Sorkin and Goh, 2008, Zwang and Yarden, 2009) (**Figure 18**). L'ubiquitinylation de l'EGF-R permet de recruter la protéine AP-2, qui elle-même interagit avec la clathrine afin d'engendrer la formation des puits recouverts de clathrine. La protéine Cbl peut également interagir directement avec l'EGF-R via la tyrosine phosphorylée 1045 (Sorkin and Goh, 2008).
- **Endocytose indépendante de la clathrine :** une endocytose médiée par des complexes riches en cholestérol tels que des radeaux lipidiques ou des cavéoles a été proposée suite à l'observation de mécanismes d'endocytose sans clathrine. Cependant, ce mécanisme semble être rare *in vivo* puisqu'il n'a été observé que lorsqu'une forte concentration d'EGF avait été administrée aux cellules (Sorkin and Goh, 2008).

Quand l'endocytose a eu lieu, les vésicules vont faire transiter le récepteur à l'EGF soit vers la surface de la cellule afin de le recycler, soit vers les lysosomes afin de le dégrader. Pour être dégradé, l'EGF-R doit d'abord transiter vers les endosomes, qui sont alors appelés les corps multivésiculaires (Sorkin and Goh, 2008). L'EGF-R est alors internalisé dans ces vésicules et de là, elles vont fusionner avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu (**Figure 19**).

Pour être recyclé, l'EGF-R internalisé dans les endosomes est ensuite redirigé vers la membrane plasmique de la cellule (**Figure 19**).

L'endocytose a également un autre rôle que celui de recycler ou de dégrader l'EGF-R puisqu'elle peut également participer à la continuité des signalisations cellulaires. En effet, certaines études ont démontré qu'il y avait encore des phosphorylations de l'EGF-R détectables après l'endocytose ainsi qu'une liaison entre EGF-R et Grb2 ou Shc (Balbis et al., 2007).

### 1.3.2. Autres voies de signalisation

Comme cela a été précisé plus haut, la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase est une grande famille, composée de plusieurs membres. Il serait fastidieux de tous les citer et expliquer les voies de signalisation qu'ils engendrent, c'est pour cela que nous ne parlerons que des principaux récepteurs ici.



#### 1.3.2.1. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF-R)

La partie extracellulaire de ce récepteur est constituée de trois membranes de type Ig-like, nommés D1, D2 et D3. Ce récepteur est activé par deux molécules de FGF venant se lier sur les domaines D2 et D3 des récepteurs par l'intermédiaire des molécules d'héparan sulfate (Lemmon and Schlessinger, 2010). C'est une voie de signalisation très importante puisqu'elle est capable d'activer un très grand nombre de réponses cellulaires telles que Ras/MAPK ; PI3K/Akt ; JNK et p38<sup>MAPK</sup> ou encore STAT3 et NF-κB (Raju et al., 2014).

#### 1.3.2.2. Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGF-R)

Il existe deux sous-types de PDGFR: PDGFRα et PDGFRβ qui se différencient par l'isoforme de PDGF qui vient s'y lier. Les récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire comprenant cinq domaines de type Ig-like, dont les domaines II et III sont utilisés par les ligands afin d'activer le récepteur via la dimérisation. Les deux types de récepteurs sont capables d'activer des voies de signalisation telles que Ras/MAPK ; PI3K/Akt ; PLCγ/DAG ou encore la voie des STATs. Les deux isoformes du récepteur se distinguent notamment par les rôles biologiques qu'elles couvrent au moment de l'embryogenèse : PDGFRα est responsable du développement du squelette, de la spermatogenèse ou encore des follicules pileux alors que PDGFRβ joue plutôt un rôle au niveau du développement des reins, des adipocytes ou encore des vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, le PDGFR est impliqué dans des processus de réparation par exemple (Heldin, 2013).

#### 1.3.2.3. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF-R)

Il s'agit d'un récepteur composé d'un domaine extracellulaire composé de sept sous-unités de type Ig-like. Il a besoin de deux molécules de VEGF pour être activé. Ce récepteur active des voies de signalisation telles que : Ras/MAPK ; PLCγ/DAG ; PI3K/Akt ou encore p38<sup>MAPK</sup> (Ivy et al., 2009). Ce récepteur est notamment exprimé dans les cellules endothéliales puisqu'il favorise l'angiogenèse via la croissance et la prolifération des cellules.

#### 1.3.2.4. Insulin Growth Factor Receptor (IGF-1R)

Ce récepteur est plus complexe que les autres puisqu'il s'agit d'un complexe tétramérique composé de deux chaînes α et de deux chaînes β. Le ligand, IGF-1, vient se lier au niveau des chaînes α, ce qui initie la dimérisation du récepteur et son activation. Les voies de signalisation activées sont Ras/MAPK ; PI3K/Akt ou encore PLCγ/DAG (Troncoso et al., 2014).

### 1.3.3. Sénescence et signalisations cellulaires

Certaines voies de signalisation voient leur efficacité perturbée au cours de la sénescence. C'est le cas par exemple de la voie de signalisation de l'EGF-R. En effet, il a été remarqué que ce récepteur subissait une répression au cours de la sénescence répliquative (Shiraha et al., 2000, Tigges et al., 2014). La perte de l'expression de l'EGF-R induit la perte d'expression

des protéines associées à cette voie telles que les protéines Erk 1 et 2 (Simpson et al., 2010). D'autres études démontrent que cette perte de réactivité du récepteur à l'EGF serait due à une surexpression de la cavéoline, une protéine membranaire présente dans les cavéoles. L'hypothèse est que la surexpression de la cavéoline induit la formation de plus de cavéoles dans la cellule, qui elles-mêmes vont interagir avec plus de récepteurs tels que le récepteur à l'EGF, créant un manque de signalisation cellulaire dépendante de ces récepteurs (Park et al., 2002, Park et al., 2000).



## 1.4.Objectifs

Le vieillissement étant caractérisé par toute une série de changements physiologiques et moléculaires, notamment au niveau des signalisations cellulaires, nous avons souhaité, lors de ce mémoire, étudier si la signalisation dépendante des radeaux lipidiques était également modifiée lors de la sénescence chez les fibroblastes humains de derme.

Les radeaux lipidiques étant des structures enrichies en cholestérol et impliquées dans la signalisation cellulaire, et notamment la signalisation dépendante du récepteur à l'EGF, nous avons voulu étudier l'effet de la perturbation de ces radeaux lipidiques, par une déplétion du cholestérol avec la méthyl-bêta-cyclodextrine (M $\beta$ CD), sur la signalisation cellulaire chez les fibroblastes. Nous avons également comparé l'effet de cette perturbation chez des fibroblastes jeunes et des fibroblastes sénescents.

La perturbation des radeaux lipidiques chez les kératinocytes entraîne une activation de la voie de signalisation dépendante de l'EGF-R. Nous nous sommes donc, dans un premier temps intéressés à cette voie chez les fibroblastes.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression de l'EGF-R dans des fibroblastes humains de derme au cours de la sénescence répllicative.

Ensuite, nous avons étudié l'effet d'une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes humains de derme, et comparé cet effet entre des cellules jeunes et des cellules sénescents.

Enfin, nous avons étudié l'effet d'une déplétion du cholestérol sur la signalisation cellulaire dépendante de l'EGF-R et des MAPK chez des fibroblastes, et comparé cette réponse chez des fibroblastes jeunes et des fibroblastes sénescents. Différents contrôles ont été réalisés afin de vérifier l'efficacité de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine chez des fibroblastes en utilisant notamment des marquages des lipides membranaires par immunofluorescence.

**Tableau 1 :**

<b>Nom</b>	<b>Firme de provenance</b>
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Suisse
L-glutamine 2 mM	Gibco, USA
Fœtal Calf Serum (FCS)	Gibco, USA
Trypsine 0,25 %	Gibco, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, USA
Bleu de trypan	Life Technologies, USA
Cellule de numération de Neubauer	Manfield, Allemagne
Boîte de culture de 75 cm <sup>2</sup>	Corning, USA
Diméthyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Cool Cell®	Biocision, USA



## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Culture cellulaire**

Deux types cellulaires différents ont été utilisés :

- Des fibroblastes humains de derme (skin Human Diploid Fibroblasts, skin HDFs) AG04431 (Coriell Institute for Medical Research, USA) car les fibroblastes constituent le type cellulaire le plus utilisé dans les études sur la sénescence répllicative (Tigges et al., 2014).
- Des kératinocytes humains normaux (NHK) sont utilisés comme contrôles positifs lors des expériences de déplétion du cholestérol avec de la méthyl- $\beta$  cyclodextrine (M $\beta$ CD) puisque l'étude de la signalisation cellulaire dans ce contexte a été particulièrement bien décrite dans ce type cellulaire (Lambert et al., 2008, Lambert et al., 2010, Lambert et al., 2006).

#### **2.1.1. Culture des fibroblastes**

**Matériel :** voir tableau 1

##### **Décongélation**

Les fibroblastes diploïdes humains de peau (HDFs) AG04431 (Coriell Institute for Medical Research, USA) sont stockés dans de l'azote liquide à -196 °C. Afin de les mettre en culture, une fiole est décongelée rapidement dans de l'eau chaude (37 °C). Le contenu de la fiole est prélevé et transféré dans du milieu Basal Medium Eagle (BME) complet à 37 °C (contenant 2 mM de L-glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal – FCS) et centrifugé pendant 7 minutes à une vitesse de 1,000 rpm. Le but de cette étape est d'éliminer toutes les traces de diméthylsulfoxyde (DMSO), agent cryoprotecteur, qui est toxique pour les cellules à température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu dans du milieu BME complet à 37 °C. Cette suspension cellulaire est ensuite transférée dans une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> et placée dans un incubateur humidifié à 37 °C et contenant 5 % de CO<sub>2</sub> afin de laisser les cellules adhérer et proliférer. Le milieu est changé le lendemain de la décongélation.

##### **Repiquage et culture des fibroblastes**

Lorsque les fibroblastes arrivent à confluence, ils peuvent être repiqués. Les cellules sont rincées deux fois dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) et trypsinisées afin d'être détachées de la boîte. Pour arrêter l'action de la trypsine, du milieu BME complet est ajouté sur les cellules. La suspension cellulaire est ensuite resuspendue avec une pipette afin d'homogénéiser les cellules et redistribuée dans deux nouvelles boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Du milieu BME complet est rajouté afin d'obtenir un volume final de 15 ml par boîte. Le milieu est changé tous les trois ou quatre jours. Des extractions d'ARN et de protéines sont réalisées tous les trois passages.

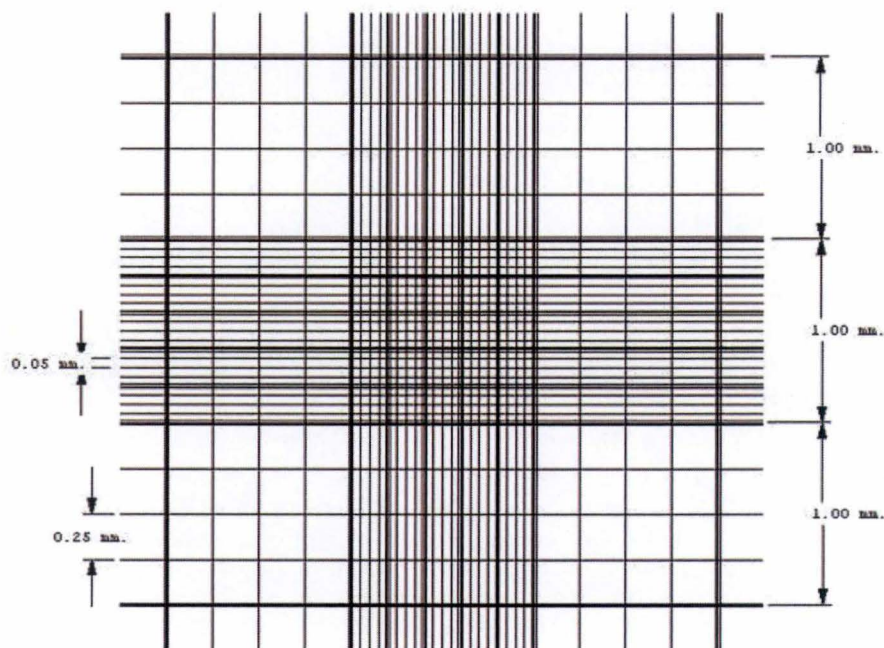


Figure 20: Cellule de numération de Neubauer ([www.celeromics.com](http://www.celeromics.com))

Tableau 2 :

Nom	Firme de provenance
Trypsine EDTA 0,5 %	Sigma-Aldrich, USA
Solution bloquante : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hepes, 30 mM</li> <li>- Glucose, 10 mM</li> <li>- KCl, 3 mM</li> <li>- NaCl, 130 mM</li> <li>- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mM</li> <li>- Rouge Phénol, 33 nM</li> </ul>	Merck, Allemagne
Centrifugeuse	Eppendorf, USA
Milieu Epilife® complet : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu Epilife®</li> <li>- Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)</li> </ul>	Cascade Biologics, Royaume-Uni
Bleu de trypan	Life Technologies, USA
Cellule de Neubauer	Manfield, Allemagne
Boîte de culture de 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one, USA



Si les cellules doivent être comptées, la suspension cellulaire peut être récupérée dans un tube falcon et centrifugée pendant sept minutes à une vitesse de 1,000 rpm afin de former un culot cellulaire. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du milieu BME complet. Un volume de 10 µl est prélevé de cette suspension et additionné de 10 µl de bleu de trypan. Ce dernier servira à colorer les cellules mortes, afin de ne pas les prendre en compte. Le mélange est introduit dans une cellule de numération de Neubauer (**Figure 20**) grâce au phénomène de capillarité et les cellules sont comptées.

### **Congélation de fibroblastes**

Les fibroblastes peuvent être congelés afin de constituer un stock de cellules qui pourront être utilisées lors d'expériences futures.

Les cellules arrivées à confluence sont lavées deux fois dans du PBS et trypsinisées afin d'être détachées de la boîte de culture. Afin de stopper la réaction de la trypsine, du milieu BME complet est ensuite ajouté sur les cellules. La suspension cellulaire est ensuite mélangée avec une pipette afin d'homogénéiser la distribution des cellules et placée dans un tube falcon afin d'être centrifugée pendant sept minutes à 1,000 rpm dans le but d'obtenir un culot cellulaire. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine, 20 % de FCS et 10 % de DMSO, agent cryoprotecteur. Cette suspension est placée dans un cryotube, lui-même placé dans une boîte « cool cell » à - 80°C. Cette étape va permettre la diminution lente de la température (1°C par minute) avant de transférer les cellules dans l'azote liquide.

### **2.1.2. Culture des kératinocytes**

**Matériel :** voir tableau 2

**Méthode :** Les kératinocytes ont été préalablement remis en culture à partir de biopsies de peau au LabCeTi. Lorsque les kératinocytes atteignent une confluence de l'ordre de 80 %, ils sont détachés par trypsinisation en ajoutant 4 ml de trypsine EDTA par boîte de 25 cm<sup>2</sup> et ce pendant deux minutes environ. Cette étape permet d'éliminer toutes les autres cellules que les kératinocytes, telles que des fibroblastes ou encore des mélanocytes, qui se détachent en très peu de temps contrairement au kératinocytes. La trypsine est alors aspirée et 4 ml de trypsine EDTA sont ajoutés sur les kératinocytes, pendant environ cinq à dix minutes. 5 ml de solution bloquante froide (4°C) sont alors ajoutés dans la boîte de 25 cm<sup>2</sup> et ce mélange est centrifugé pendant cinq minutes à une vitesse de 1.000 rpm à 4°C. Le culot obtenu est ensuite resuspendu dans 10 ml de milieu Epilife® complet. Une faible quantité de cette suspension est prélevée afin de procéder au comptage cellulaire grâce à la cellule de numération de Neubauer, comme expliqué plus haut. Les cellules sont ensuite redistribuées dans quatre nouvelles boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Ces dernières sont placées dans un incubateur humidifié à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> afin de laisser les cellules adhérer et proliférer. Le milieu de culture est remplacé tous les deux à trois jours (Minner et al., 2010).

**Tableau 3 :**

Nom	Firme de provenance
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Suisse
Solution de fixation contenant : <ul style="list-style-type: none"><li>- 2 % de formaldéhyde</li><li>- 0,2 % de glutaraldéhyde</li></ul>	Carlo Erba, Italie Sigma-Aldrich, USA
Solution de tampon phosphate, pH 6,0 : <ul style="list-style-type: none"><li>- <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math>, 0,1 M</li><li>- <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> 0,1 M</li></ul>	Merck, Allemagne Merck, Allemagne
Solution de coloration (pour 7 ml) : <ul style="list-style-type: none"><li>- 1,4 ml de tampon phosphate pH 6,0</li><li>- 350 <math>\mu\text{l}</math> d'une solution de ferrocyanure de potassium 0,1M</li><li>- 350 <math>\mu\text{l}</math> d'une solution de ferricyanure de potassium</li><li>- 840 <math>\mu\text{l}</math> d'une solution de NaCl 2,5M</li><li>- 14 <math>\mu\text{l}</math> d'une solution de <math>\text{MgCl}_2</math> 1M</li><li>- 3,7 ml d'eau distillée</li><li>- 7 mg de X-gal dissout dans 350 <math>\mu\text{l}</math> de N,N diméthylformamide</li></ul>	Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Biosolve BV, Pays-Bas Jansen Chimica, Belgique
Méthanol	Fisher Scientific, USA



## 2.2. Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal)

**Principe :** La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme lysosomale dont le rôle est d'hydrolyser les  $\beta$ -galactosides en monosaccharides. En conditions physiologiques normales, cette enzyme est active à un pH de 4,0. Lors de la sénescence, son activité peut être détectée au pH suboptimal de 6,0 du fait de son augmentation d'expression (Dimri et al., 1995). Cette activité SA- $\beta$ gal peut être utilisée comme biomarqueur de la sénescence en incubant les cellules dans un tampon à un pH de 6,0 en présence de X-gal, substrat chromogénique de la  $\beta$ -galactosidase, et ce pendant 16 heures. Le clivage du X-gal libère sa partie indolique formant un précipité bleu. Les cellules sénescents deviendront donc bleues et seront faciles à distinguer des cellules non sénescents.

**Matériel :** voir tableau 3

**Méthode :** Les cellules sontensemencées dans une plaque 6-puits à une densité de 1000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, le test SA- $\beta$ gal est réalisé de la manière décrite par Dimri et al. en 1995. Les cellules sont rincées deux fois dans du PBS puis fixées pendant cinq minutes dans la solution de fixation. Ensuite, elles sont de nouveau rincées deux fois dans du PBS et puis mises en présence de la solution de coloration pendant 16 heures à 37°C, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite rincées deux fois dans du PBS, suivi de deux rinçages dans du méthanol. La plaque est ensuite séchée et conservée dans du papier aluminium à l'abri de la lumière.

## 2.3. Traitements appliqués aux cellules

### 2.3.1. Stimulation avec de l'EGF

**Matériel :** voir tableau 1

EGF (R&D systems, Royaume-Uni)

**Méthode :** Les fibroblastes sontensemencés dans de boîtes de 25 cm<sup>2</sup> à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules jeunes) ou 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules âgées) dans du milieu BME complet afin d'atteindre une confluence de plus ou moins 80 % le lendemain.

Après 24 heures, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS et le milieu est remplacé par du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine mais sans sérum pendant 1 heure ou 16 heures (déprivation en sérum). Les cellules sont ensuite incubées avec de l'EGF à différentes concentrations (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml ou 100 ng/ml) dilué dans du milieu BME sans sérum pendant différents temps (15 minutes ou 20 minutes). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF.

### 2.3.2. Traitement avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD)

**Principe :** La méthyl- $\beta$  cyclodextrine (M $\beta$ CD) est une molécule de glucose heptamérique utilisée afin de dépléter le cholestérol membranaire. En effet, sa conformation en forme de « donut » lui permet de séquestrer le cholestérol membranaire en son centre et donc de le retirer de la membrane plasmique. Cette molécule a été très utilisée afin d'étudier les rôles des

radeaux lipidiques dans la signalisation cellulaire, et notamment celle qui est dépendante de l'EGF-R.

**Matériel :** voir tableau 1

Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD, Sigma-Aldrich, USA)

**Méthode :** Pour les fibroblastes, les cellules sontensemencées dans de boîte de 25 cm<sup>2</sup> à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (sous-confluence) ou 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (confluence) dans du milieu BME complet. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu BME sans sérum contenant 2 mM de L-glutamine pendant 1 heure ou 16 heures. Ensuite, les cellules sont incubées avec de la M $\beta$ CD à différentes concentrations (5 mM, 7,5mM ou 10 mM) diluée dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine sans sérum et pendant différents temps (20 min, 40 min, 60 min ou 120 min). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD.

Pour les kératinocytes, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre à une densité de 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu Epilife® complet afin d'atteindre la confluence le lendemain. Les cellules sont ensuite incubées avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM diluée dans du milieu Epilife® complet pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD.

### **2.3.3. Traitement avec un inhibiteur du domaine tyrosine kinase de l'EGF-R**

**Principe :** La molécule PD153035 est un inhibiteur spécifique et compétitif du domaine tyrosine kinase du récepteur à l'EGF. L'utilisation de cet inhibiteur bloque la phosphorylation du récepteur à l'EGF et donc, les signalisations qui en dépendent.

**Matériel :** voir tableau 1

PD153035 (Calbiochem, USA)

**Méthode :** Les fibroblastes sontensemencés dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules jeunes) ou 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules âgées) dans du milieu BME complet afin d'atteindre la confluence le lendemain. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum pendant 16 heures. Ensuite, les cellules sont pré-traitées pendant 30 minutes avec le PD153035, utilisé à une concentration de 500 nM, dilué dans du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum. Après ce pré-traitement, les cellules sont rincées une fois avec du PBS puis traitées avec de la M $\beta$ CD diluée dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine mais sans sérum pendant 1 heure ou sont stimulées avec de l'EGF dilué dans du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être pré-traitées avec PD153035 et/ou traitées avec de la M $\beta$ CD ou l'EGF.



**Tableau 4 :**

Nom	Firme de provenance
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Suisse
Cell Scraper	TechnoPlastic Products, Suisse
Kit d'extraction d'ARN : RNeasy mini kit	Qiagen, USA
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1 %	MP Biochemicals, France
Ethanol 70 %	Merck, Allemagne
Spectromètre Nanodrop Ultraspec 2100 pro	Ammersham Biosciences, Royaume-Uni
Logiciel MDM 2.2.3	Ammersham Biosciences, Royaume-Uni

**Tableau 5 :**

Nom	Firme de provenance
Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit: <ul style="list-style-type: none"><li>- Anchored-oligo (dT) 18 primer (50 pmol/μl)</li><li>- Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5X)</li><li>- Protector RNase Inhibitor (40 U/μl)</li><li>- Deoxynucleotide (10 mM)</li><li>- Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl)</li><li>- Eau miliQ RNase free</li></ul>	Roche, Allemagne

## **2.4. Analyses en PCR semi-quantitative en temps réel (RT-qPCR)**

### **2.4.1. Extraction et dosage d'ARN**

**Matériel :** voir tableau 4

**Méthode :** Toute manipulation de l'ARN nécessite des conditions de travail « RNase free » c'est-à-dire qu'il faut détruire les ribonucléases qui peuvent dégrader l'ARN. Pour ce faire, la paillasse et le matériel utilisés sont nettoyés avec du SDS 1%.

Les fibroblastes sont rincés une fois dans du PBS chaud et RNase free. Ensuite, les cellules sont lysées grâce au tampon RLT du kit RNeasy Mini Kit de Qiagen (600 µl/T75 ; 350 µl/T25). Les lysats cellulaires sont ensuite récoltés dans des eppendorfs et vortexés durant 15 secondes avant d'être rapidement congelés à -80°C.

L'ARN total est extrait en utilisant le kit RNeasy Mini Kit et le Qiacube (Qiagen) en suivant les instructions de la firme. Quand les ARN ont été extraits, les échantillons sont rapidement récupérés et transférés sur glace car l'ARN se dégrade très facilement. Ils peuvent ensuite être dosés grâce au spectromètre Nanodrop Ultraspec 2100 pro (Amarsham, Biosciences, Rayaume-Uni). Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C.

### **2.4.2. Rétro-transcription**

**Principe :** Grâce à cette étape, les échantillons d'ARN vont pouvoir être synthétisés en brins d'ADN complémentaires (ADNc). Cette réaction est possible grâce à la Reverse Transcriptase, une enzyme permettant la synthèse de brins d'ADN sur base de brins d'ARN. Cette réaction permet ainsi d'obtenir la séquence codante de l'ARN de notre échantillon.

**Matériel :** voir tableau 5

**Méthode :** L'ARN total (1 µg) est mélangé à de l'eau RNase free afin d'obtenir un volume final de 12 µl. A ce mélange est ajouté 1 µl d'anchored-oligo (dT) 18 Primer et ce mélange est chauffé à 65°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont directement replacés sur glace et puis incubés en présence d'un mélange contenant 4 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl de Protector RNase Inhibitor, 2 µl de Deoxynucleotide Mix et 0,5 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase par échantillon. Ils sont ensuite placés à 55°C pendant 30 minutes. A la fin de cette étape, les échantillons sont placés à 85°C pendant 5 minutes. Cette dernière étape permet d'inhiber la Reverse Transcriptase. Les échantillons obtenus sont donc de l'ADNc et sont stockés à -20°C.

### **2.4.3. PCR semi-quantitative en temps réel**

**Principe :** La Polymerase Chain Reaction (PCR) semi-quantitative en temps réel est une application de la PCR qui permet de suivre en temps réel l'amplification des fragments en détectant la fluorescence émise par les produits PCR nouvellement synthétisés. La fluorescence est émise grâce au SYBRGreen, un agent intercalant fluorescent. Plus le nombre d'amplicons créés durant la réaction PCR est élevé, plus la fluorescence sera élevée également. Il suffira alors de quantifier la fluorescence émise afin de quantifier le gène



**Tableau 6 :**

Nom	Firme de provenance
Fast Start Universal SYBR Green Master Mix	Roche, Allemagne
Appareil Real-Time StepOnePlus	Applied Biosystems, USA
Logiciel SDS 2.2	Applied Biosystems, USA
Eau miliQ RNase free	/
Amorces (voir tableau n°7)	Applied Biosystems, USA

**Tableau 7 :**

Gène cible	Abréviation	Amorce sens	Amorce anti-sens
Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	GAPDH	ACC CAC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA
Epidermal Growth Factor Receptor	EGF-R	AGC CCA TGA GAA ATT TAC AG	GCA CAG GGC AGG GTT GTT
Cyclin-dependant kinase inhibitor 2a	p16	GCC CAA CGC ACC GAA TAG T	CGC TGC CCA TCA TCA TGA C
Ostéonectine	Ostéo	GAG ACC TGT GAC CTG GAC AATG	GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA
Fibronectine	Fibro	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T	GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT
Apolipoprotéine J	ApoJ	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG	CAG CGA CCT GGA GGG ATT C
Transgelin	SM22	CGT GGA GAT CCC AAC TGG TT	AAG GCC AAT GAC ATG CTT TCC
Connective Tissue Growth Factor	CTGF	CAA GCT GCC CGG GAA AT	GGA CCA GGC AGT TGG CTC TA
Matrix metalloproteinase 1	MMP-1	CAT GCG CAC AAA TCC CTT CTA	GAA CAG CCC AGT ACT TAT TCC CTT T
Matrix metalloproteinase 3	MMP-3	TTT GGC CCA TGC CTA TGC	CCA GGG AGT GGC CAA TTT C
p53	p53	AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA	CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA
Insulin-Growth Factor Binding Protein 3	IGFBP3	CAG AGC ACA GAT ACC CAG AAC	CAC ATT GAG GAA CTT CAG GTG ATT
Insulin-Growth Factor Binding Protein 5	IGFBP5	TGT GAC CGC AAA GGA TTC TAC A	TCC CCG TCA ACG TAC TCC AT
Transforming-Growth Factor β1	TGF-β1	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT	CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA

**Tableau 8 :**

Nom	Firme de provenance
Tampon de lyse (pour 1 ml): <ul style="list-style-type: none"> <li>- 410 µl d'eau miliQ</li> <li>- 500 µl de tampon de lyse 2X, pH 7,5 contenant :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris 80 mM</li> <li>• KCl 300 mM</li> <li>• EDTA 2 mM</li> </ul> </li> <li>- 40 µl de PIC (Protease Inhibitor Cocktail)</li> <li>- 40 µl de PIB (Phosphate Inhibitor Buffer) contenant:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 25 mM</li> <li>• PNPP 250 mM</li> <li>• β-glycérophosphate 250 mM</li> <li>• NaF 125 mM</li> </ul> </li> <li>- 10 µl de Triton X-100</li> </ul>	Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Roche, Allemagne  Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA Ronacare, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Suisse
Cell Scraper	TechnoPlastic Products, Suisse
Centrifugeuse	Eppendorf, USA

analysé. La quantification est basée sur le calcul du nombre de cycles qu'il aura fallu pour que la fluorescence dépasse un certain seuil (Ct, Cycle Threshold) (Schmittgen and Livak, 2008). Les valeurs sont ensuite normalisées par rapport à un gène de référence, dont l'expression est stable dans les conditions testées.

**Matériel :** voir tableau 6

**Méthode :** Pour chaque échantillon testé, un mélange est réalisé. Ce dernier comprend 5 µl de l'ADNc dilué 100X, 2,5 µl d'amorce sens (3 µM), 2,5 µl d'amorce anti-sens (3 µM), 12,5 µl de SYBRGreen PCR Mastermix et 2,5 µl d'eau distillée. Pour les contrôles « blanc », l'ADNc a été remplacé par 5 µl d'eau distillée. Les échantillons sont chargés dans une plaque 96-puits et cette dernière est ensuite centrifugée pendant 1 minute à une vitesse de 600 rpm. La réaction PCR est réalisée grâce à la machine StepOnePlus (Applied Biosystems, Pays-Bas). La première étape est un départ à 95°C pendant 5 minutes, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 65°C pendant 1 minute. Les données sont analysées en utilisant le logiciel Thermal Cycler (Applied Biosystems, Pays-Bas). L'abondance relative a été déterminée en analysant la différence des Ct comme cela a été décrit par Schmittgen and Livak en 2008 et normalisée en utilisant le gène de référence GAPDH. Un cutoff de 30 % est utilisé afin de décider de la surexpression ou de la répression d'un gène.

Les amorces qui ont été utilisées sont référencées dans le tableau 7.

## **2.5. Analyses en Western blot**

### **2.5.1. Extraction des protéines**

**Matériel :** voir tableau 8

**Méthode :** Les cellules sont lysées sur glace dans 150 µl de tampon de lyse avec un grattoir de cellules et centrifugées pendant 10 minutes à 4°C à 13.000 rpm.

### **2.5.2. Dosage protéique**

**Principe :** Le dosage des protéines est réalisé grâce à la méthode de Pierce. Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur la liaison d'un complexe métal-colorant aux protéines dans des conditions acides, ce qui va provoquer un changement dans l'absorption maximale du colorant, mesurée à une longueur d'onde de 660 nm. Le complexe métal-colorant est brun rougeâtre et vire au vert quand il se lie aux protéines. La couleur produite est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Le changement de couleur est produit par déprotonation du colorant à un pH faible, facilité par les interactions de liaison aux protéines via des groupements positifs d'acides aminés et la charge négative du complexe métal-colorant.

**Matériel :** Pierce 660 (Thermo Scientific, USA)  
BSA (2 µg/µl, Thermo Scientific, USA)

**Méthode :** Chaque condition est testée en double afin d'en faire la moyenne et le dosage se réalise avec un volume final de 10 µl par puits. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA : 0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 8 ; 10 µg). Un volume de 2 µl des échantillons



**Tableau 9 :**

<b>Nom</b>	<b>Firme de provenance</b>
Stacking gel : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Polyacrylamide 40 % 1 ml</li> <li>- Tris HCl, pH 6,8 2,5 ml</li> <li>- SDS 1 % 0,1 ml</li> <li>- Ammonium Persulfate (APS) 0,1 ml</li> <li>- TEMED 10 µl</li> <li>- Eau distillée 6,34 ml</li> </ul>	Sigma-Aldrich, USA VWR Chemicals, Belgium MP Biochemicals, Belgique Sigma-Aldrich, USA Fisher Scientific, USA /
Running gel : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Polyacrylamide 40 % 3,1 ml</li> <li>- Tris HCl, pH 8,8 2,5 ml</li> <li>- SDS 1 % 0,1 ml</li> <li>- Ammonium Persulfate (APS) 0,1 ml</li> <li>- TEMED 10 µl</li> <li>- Eau distillée 4,12 ml</li> </ul>	Sigma-Aldrich, USA VWR Chemicals, Belgium MP Biochemicals, Belgique Sigma-Aldrich, USA Fisher Scientific, USA /
Bleu de bromophénol	Sigma-Aldrich, USA
Tampon d'électrophorèse : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris HCl</li> <li>- Glycine</li> <li>- SDS</li> </ul>	VWR Chemicals, Belgium Fisher Scientific, USA MP Biochemicals, Belgique
Membrane PVDF	Thermo Scientific, USA
PBS-Tween 0,1 % : <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS (NaCl 9g/L, pH 7,4)</li> <li>- Eau distillée</li> <li>- Tween 20</li> </ul>	/ / Fisher Scientific, USA
PBS-Tween 0,1 % + 5 % de lait : <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS-Tween 0,1 %</li> <li>- Lait en poudre</li> </ul>	Nestlé, Suisse
Kit de revelation : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 µl de substrat bloquant A</li> <li>- 5 µl de substrat bloquant B</li> </ul>	Roche Diagnosis, Allemagne
ImageQuant 350	GE Healthcare, Belgique

**Tableau 10 :**

Nom	Abréviation	Firme de provenance	Dilution	PM
Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor	pEGF-R (Tyr1173)	Invitrogen, USA	1 :1000	175 kD
Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor	pEGF-R (Tyr995)	Cell Signaling, USA	1 :1000	175 kD
Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor	pEGF-R (Tyr1045)	Cell Signaling, USA	1 :1000	175 kD
Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor	pEGF-R (Tyr1068)	Cell Signaling, USA	1 :1000	175 kD
Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor	pEGF-R (Ser1046/1047)	Cell Signaling, USA	1 :1000	175 kD
Epidermal Growth Factor Receptor	EGF-R	Cell Signaling, USA	1 :1000	175 kD
Phosphorylated p38 Mitogen Activated Protein Kinase	pp38	Cell Signaling, USA	1 :1000	43 kD
p38 Mitogen Activated Protein Kinase	p38	Cell Signaling, USA	1 :1000	43 kD
Phosphorylated Extracellular Regulated Kinase 42/44	pErk 1/2	Cell Signaling, USA	1 :1000	42/44 kD
Extracellular Regulated Kinase 42/44	Erk 1/2	Cell Signaling, USA	1 :1000	42/44 kD
Phosphorylated Protein Kinase B	pAkt	Cell Signaling, USA	1 :1000	60 kD
Protein Kinase B	Akt	Cell Signaling, USA	1 :1000	60 kD
Cyclin-dependant kinase protein 2a	p16	Invitrogen, USA	1 :1000	16 kD
Alpha-tubuline	$\alpha$ -tubuline	Sigma-Aldrich, USA	1 :10000	50 kD
Ribosomal Protein 13a	RPL13a	Cell Signaling, USA	1 :1000	23 kD
Anti-lapin couple à la HRP	/	Cell Signaling, USA	1 :5000	/
Anti-souris couple à la HRP	/	Cell Signaling, USA	1 :5000	/



et du tampon de lyse (ce dernier est testé en triplicat) est prélevé et déposé dans les puits et complété avec 8 µl d'eau distillée. 150 µl de réactif de Pierce est ajouté ensuite par puits et ensuite la plaque entière est vortexée pendant 5 minutes à une vitesse de 100 rpm, à l'abri de la lumière. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 660 nm et les valeurs sont ensuite utilisées pour calculer la concentration protéique des échantillons.

### 2.5.3. Western blot en SDS-PAGE

**Principe :** La technique du Western blot est une technique permettant de séparer et d'identifier les protéines contenues dans un échantillon. Les protéines sont séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sur base de leur poids moléculaire. Les protéines séparées sur gel sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) pour ensuite être repérées grâce à des anticorps spécifiques. Ces anticorps sont ensuite détectés par chémoluminescence.

**Matériel :** voir tableau 9

**Méthode :** Une quantité précise (entre 5 et 10 µg) de protéines est chargée sur le gel de polyacrylamide. Elles sont d'abord concentrées dans le gel de concentration (stacking gel) et puis séparées dans le gel de séparation (running gel). Le front de migration est repéré par le marquage des protéines avec le bleu de bromophénol, dilué cinq fois. Le SDS, présent dans les gels, est dénaturant pour les protéines. L'électrophorèse se réalise à un voltage de 120 volts pendant 1h30 environ, dans le tampon d'électrophorèse. Une étape de transfert a alors lieu, étape pendant laquelle les protéines sont transférées du gel vers la membrane de PVDF. Cette étape est réalisée à un voltage de 90 volts pendant 1h30 environ. La membrane est ensuite incubée pendant une heure à température ambiante dans du PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait afin de saturer les liaisons non spécifiques. Ensuite, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait. La membrane est lavée trois fois pendant 10 minutes dans du PBS-Tween 0,1 %. L'anticorps secondaire utilisé est dilué dans du PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait et est couplé avec la HRP (Horse Radish Peroxidase). La membrane est incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire et ensuite lavée trois fois dans du PBS-Tween 0,1 %. La membrane est ensuite incubée dans 500 µl de substrat bloquant A et 5 µl de substrat bloquant B pendant 1 minute environ (Kit de révélation). Les protéines sont révélées en utilisant l'ImageQuant (GE Healthcare, Belgique). Les résultats sont quantifiés en utilisant le logiciel QuantityOne (Bio-Rad, USA). Les anticorps utilisés sont référencés dans le tableau 10.

## 2.6. Etudes d'imagerie

### 2.6.1. Localisation du récepteur à l'EGF : immunofluorescence

**Principe :** La technique de l'immunofluorescence est basée sur la détection d'une protéine grâce à un anticorps primaire. Ce dernier est ensuite reconnu par un anticorps secondaire, lui-même couplé avec un fluorochrome. Ce dernier va pouvoir être excité grâce à une longueur d'onde d'excitation et la protéine d'intérêt sera alors repérable indirectement via la détection

**Tableau 11 :**

Nom	Firme de provenance
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Belgique
L-glutamine 2 mM	Gibco, USA
Fœtal Calf Serum (FCS)	Gibco, USA
Plaque 24-puits	Corning, USA
EGF	R&D systems, Royaume-Uni
MβCD	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldéhyde 4 % dans PBS	Merck, Allemagne
PBS « Home Made » (1L) : - 9g NaCl - 20 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Eau distillée	Merck, Allemagne Merck, Allemagne
PBS + 1 % Triton X-100 : - PBS 9g NaCl, pH 7,4 - Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
PBS + 3 % BSA : - PBS 9g NaCl, pH 7,4 - BSA en poudre	Santa Cruz Biotchenology, USA
TO-PRO3	Molecular Probes, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
Chambre humide	/
Parafilm	/
Eau distillée	/
Microscope confocal	Leica, Allemagne

**Tableau 12 :**

Nom	Abréviation	Firme de provenance	Dilution
Anti-Epidermal Growth Factor Receptor	Anti-EGF-R	Cell Signaling, USA	1 :100
Anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488	LV	Molecular Probes, USA	1 :1000
Anti-lysosomal Associated Membrane Protein 1	Anti-LAMP1	Developpemental Studies Hybridoma Bank	1 :100
Anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa 476	SR	Molecular Probes, USA	1 :1000



de la lumière émise en longueur d'onde d'émission, grâce à un microscope confocal à fluorescence.

**Matériel :** voir tableau 11

**Méthode :** Les cellules sontensemencées à une densité de 10,000 cellules/cm<sup>2</sup> dans une plaque 24-puits dans du milieu BME complet sur des lames couvre-objets. Le lendemain, les cellules sont rincées une fois avec du PBS avant d'être incubées dans du milieu BME sans sérum et contenant 2 mM de L-glutamine pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec de l'EGF (10 ng/ml pendant 5, 15 ou 30 minutes) ou traitées avec de la M $\beta$ CD (7,5 mM pendant 20, 40 ou 60 minutes). Les cellules contrôles sont incubées dans les mêmes conditions sans stimulation avec de l'EGF ou traitement avec de la M $\beta$ CD. Après le traitement, les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans de la formaldéhyde diluée à 4 % dans du PBS ou dans un mélange composé de 80 % de méthanol et de 20 % d'acétone si un marquage LAMP-1 doit être fait et rincées trois fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées dans du PBS+ 1 % de Triton X-100 et lavées trois fois avec du PBS + 3 % de BSA. L'anticorps primaire dirigé contre EGF-R (et LAMP-1 si le marquage doit se faire) est ajouté et incubé toute la nuit à 4°C dans une chambre humide. Ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS + 3% de BSA avant d'ajouter l'anticorps secondaire anti-lapin (et anti-souris pour le marquage LAMP-1) durant une heure dans une chambre humide et à température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois dans du PBS + 3% de BSA et une fois dans du PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 35 minutes avec du TO-PRO3 et ensuite lavées trois fois avec du PBS. Les couvre-objets sont montés sur des lames de microscope avec du Mowiol et visualisés par microscopie confocale. La liste des anticorps utilisés est référencée au tableau 12.

### 2.6.2. Localisation des lipides membranaires : analogues de lipides fluorescents

**Principe :** Le marquage des lipides membranaires utilise la technique des BODIPY (Bore dipyrométhène). Ces sondes ont la particularité d'absorber la lumière sous forme UV et d'émettre alors de la fluorescence. La sonde BODIPY que nous avons utilisée est un analogue du lipide membranaire sphingomyéline (BODIPY-SM). Leur particularité est qu'ils sont peu invasifs en comparaison aux BODIPY habituels puisqu'ils créent peu de différences de liaison par rapport à la molécule endogène (D'Auria et al., 2013). En plaçant ces sondes sur les cellules vivantes, il est alors possible de visualiser des lipides de la membrane plasmique externe dans la cellule au repos, mais aussi de tester l'effet d'une perturbation de la membrane plasmique sur ces lipides.

**Matériel :** Sonde BODIPY-SM (Invitrogen, USA)  
Lysénine (Invitrogen, USA)

**Méthode :** Les cellules sontensemencées à une densité de 10,000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des chambres de culture de type Lab-Tek dans du milieu BME complet. Elles pourront ainsi proliférer pendant deux jours avant le traitement. Les cellules sont ensuite lavées dans du milieu BME sans sérum contenant 2 mM de L-glutamine froid (4°C) et cela trois fois de suite. Elles sont ensuite mises en présence de 400  $\mu$ l de la sonde BODIPY-SM 1  $\mu$ M (diluée dans le milieu BME) pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées quatre fois avec du

**Tableau 13 :**

<b>Nom</b>	<b>Firme de provenance</b>
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS pH 7,4 ; 10 mM ; 0,9g NaCl)	Lonza, Belgique
L-glutamine 2 mM	Gibco, USA
Fœtal Calf Serum (FCS)	Gibco, USA
Plaque 24-puits	Corning, USA
MβCD	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldéhyde 4 % dans PBS	Merck, Allemagne
Filipine	Sigma-Aldrich, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA



milieu BME froid (4°C) contenant 2 mM de L-glutamine puis placées dans du milieu BME chaud contenant 2 mM de L-glutamine avant d'aller les observer au microscope confocal.

### **2.6.3. Localisation des lipides membranaires : lysénine**

**Principe :** La lysénine est une toxine spécifique de la sphingomyéline. La lysénine permet de marquer la sphingomyéline car elle lyse la cellule en formant des pores.

**Matériel :** Lysénine (Invitrogen, USA)

**Méthode :** Les cellules sontensemencées à une densité de 10,000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des chambres de culture de type Lab-Tek dans du milieu BME complet. Elles pourront ainsi proliférer pendant deux jours avant le traitement. Les cellules sont ensuite lavées dans du milieu BME sans sérum contenant 2 mM de L-glutamine froid (4°C) et cela trois fois de suite. Elles sont ensuite mises en présence de 400 µl de lysénine 1 µM (diluée dans le milieu BME) pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées quatre fois avec du milieu BME froid (4°C) contenant 2 mM de L-glutamine puis placées dans du milieu BME chaud contenant 2 mM de L-glutamine avant d'aller les observer au microscope confocal.

### **2.6.4. Détection du cholestérol cellulaire par la filipine**

**Principe :** Le cholestérol peut être détecté en microscopie grâce à une molécule fluorescente nommée filipine. Cette dernière est dotée d'une fluorescence naturelle et est capable de se lier de manière sélective au cholestérol (en se fixant sur le groupement stérol) présent dans les cellules. La fluorescence devient détectable quand on place les cellules marquées sous des UV (Porn and Slotte, 1995).

**Matériel :** voir tableau 13

**Méthode :** Les cellules sontensemencées à une densité de 10.000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des lames couvre-objets dans une plaque 24-puits et dans du milieu BME complet. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS avant d'être incubées dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine mais pas de sérum pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite traitées avec de la MβCD diluée dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine mais pas de sérum à 7,5 mM pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD. Après l'incubation, les cellules sont rincées une fois avec du PBS et puis fixées dans la formaldéhyde à 4 % dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois pendant trois minutes dans du PBS puis traitées pendant 30 minutes avec de la filipine (Sigma-Aldrich, USA) préparée à une concentration de 50 µg/ml dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS puis les lames couvre-objets sont montées sur des lames de microscope avec du Mowiol. Les lames sont analysées par microscopie à fluorescence sous excitation en lumière UV.

**Tableau 14 :**

<b>Nom</b>	<b>Firme de provenance</b>
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, USA
L-glutamine 2 mM	Gibco, USA
Fœtal Calf Serum (FCS)	Gibco, USA
Boîte de culture de 25 cm <sup>2</sup>	Corning, USA
Sonicateur	Branson, USA
Eau distillée	/
Chloroforme	Fisher Scientific, USA
Méthanol	Fisher Scientific, USA
NaCl 0,05M	VWR Chemicals, Belgique
CaCl <sub>2</sub> 0,36M	Vel SA, Belgique
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Acétone	Fisher Scientific, USA
Speed-vac (Machine Dri-Block DB-3A)	Techne/Analys, Belgique



## 2.7. Contenu en cholestérol

### 2.7.1. Extraction du cholestérol cellulaire

**Principe :** L'extraction du cholestérol cellulaire est basée sur une immersion de cellules dans un mélange de chloroforme et de méthanol afin de séparer le lysat en différentes phases, ce qui permettra d'isoler les lipides. La suite est basée sur une série d'étapes de lavages et de centrifugations afin de bien séparer les lipides du reste des composants cellulaires. Le cholestérol est solubilisé grâce à l'ajout de Triton X-100 dans l'échantillon. Cette étape est suivie par une étape de speed-vac afin d'éliminer le chloroforme et de ne récupérer que le cholestérol sous forme d'un culot, qui sera ensuite resuspendu.

**Matériel :** voir tableau 14

**Méthode :** Les cellules sontensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules jeunes) ou 12.000 cellules/cm<sup>2</sup> (cellules âgées) dans du milieu BME complet afin d'atteindre une confluence de 80 % environ le lendemain. Les cellules sont grattées dans 1 ml d'eau désionisée et ensuite soniquées pendant cinq minutes. 200 µl de ce lysat sont récupérés afin de procéder au dosage protéique. Le reste des lysats cellulaires est ensuite plongé dans un mélange de 3 ml de chloroforme et de méthanol (2 :1). Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 60 secondes et ensuite centrifugés pendant 15 minutes à température ambiante et à une vitesse de 3.000 rpm, cela afin de laver la phase organique. Cette dernière est ensuite collectée dans un nouveau tube et lavée dans 2 ml de NaCl 0,05M. Les échantillons sont ensuite de nouveau vortexés et centrifugés pendant 15 minutes à température ambiante et à 3.000 rpm. La phase organique est ensuite lavée deux fois dans un mélange de CaCl<sub>2</sub> 0,36M et de méthanol (1 :1), puis l'ensemble est vortexé et centrifugé pendant 15 minutes à une température ambiante et à 3.000 rpm. La phase organique est ensuite collectée et mélangée avec du Triton X-100 et de l'acétone (1 :1). Les échantillons sont ensuite évaporés à sec sous flux d'air (Machine Dri-Block DB-3A de Techne/Analisis) pendant 1h30 et les culots de cholestérol sont resuspendus dans de l'eau désionisée. Ils sont conservés à -20°C si le dosage ne se fait pas de suite.

### 2.7.2. Dosage du cholestérol cellulaire

**Principe :** Le principe du dosage du cholestérol est basé sur sa détection grâce à une méthode fluorométrique. En effet, la plus grande partie du cholestérol dans le sang est sous forme de cholestéryl ester. Ce dernier peut être estérifié en cholestérol grâce à la cholestérol estérase. Ce cholestérol peut ensuite être oxydé grâce à la cholestérol oxydase en cétone. Cette réaction libère du peroxyde d'hydrogène. En ajoutant l'Amplex Red Agent du kit, couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase), on peut détecter la présence de peroxyde d'hydrogène, et donc indirectement le cholestérol, car la réaction provoque la formation d'un composé fluorescent, la résorufine.

**Matériel:** Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen, USA)

**Méthode :** La détection du cholestérol commence par la préparation du tampon de réaction : diluer 2,5 ml de la solution stock dans 10 ml d'eau désionisée. Il faut ensuite préparer la courbe standard grâce au composant cholestérol standard en le diluant dans le tampon de



réaction 1X. Des dilutions allant de 10 µg/ml à 0 µg/ml doivent être réalisées. Il faut ensuite diluer 5X nos échantillons dans le tampon de réaction 1X afin d'avoir un volume final de 200 µl. Il faut déposer 50 µl de nos échantillons et de la courbe standard par puits. Chaque condition est testée en triplicat. Il faut également prévoir un standard de résorufine et un contrôle positif de peroxyde d'hydrogène. Enfin, il faut ajouter 50 µl par puits de la solution d'Amplex Red Reagent préparée comme suit : 15 µl d'Amplex Red, 10 µl de HRP, 10 µl de cholestérol oxydase, 1 µl de cholestérol estérase et 964 µl de tampon de réaction 1X. La plaque est ensuite incubée à l'abri de la lumière et pendant 45 minutes à 37°C. La fluorescence est ensuite mesurée grâce à un fluorimètre en utilisant la longueur d'onde d'émission 578 nm et de réception 612 nm.

## 2.8.PathScan Antibody Array

**Principe :** Il s'agit d'un kit de détection de certains récepteurs à activité tyrosine kinase et de molécules de signalisation par une méthode basée sur la chémoluminescence. Les membranes disponibles dans le kit sont recouvertes d'anticorps spécifiques de récepteurs ou de molécules de signalisation associées. L'échantillon est déposé sur la membrane et la détection des récepteurs et des molécules de signalisation se fait grâce à un cocktail d'anticorps secondaires qui seront eux-mêmes détectés grâce à l'ajout de la *Horseradish* Peroxydase (HRP) couplée à de la streptavidine. Cette technique permet donc d'avoir une vue d'ensemble sur les récepteurs et les molécules de signalisation associées qui sont activés dans les cellules.

**Matériel:** Kit PathScan RTK Signaling antibody array kit (Cell Signaling, USA)

**Méthode :** Les fibroblastes sont ensemencés dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet afin d'atteindre la confluence le lendemain. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum pendant 16 heures. Ensuite, les cellules sont pré-traitées pendant 30 minutes avec le PD153035, utilisé à une concentration de 500 nM, dilué dans du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum. Après ce pré-traitement, les cellules sont rincées une fois avec du PBS puis traitées avec de la MβCD diluée dans du milieu BME contenant 2 mM de L-glutamine mais sans sérum pendant 1 heure ou sont stimulées avec de l'EGF dilué dans du milieu BME contenant de la L-glutamine à 2 mM mais sans sérum pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être pré-traitées avec PD153035 et/ou traitées avec de la MβCD ou l'EGF.

Pour les kératinocytes, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre à une densité de 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu Epilife® complet afin d'atteindre la confluence le lendemain. Les cellules sont ensuite incubées avec de la MβCD à une concentration de 7,5 mM diluée dans du milieu Epilife® complet pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD.

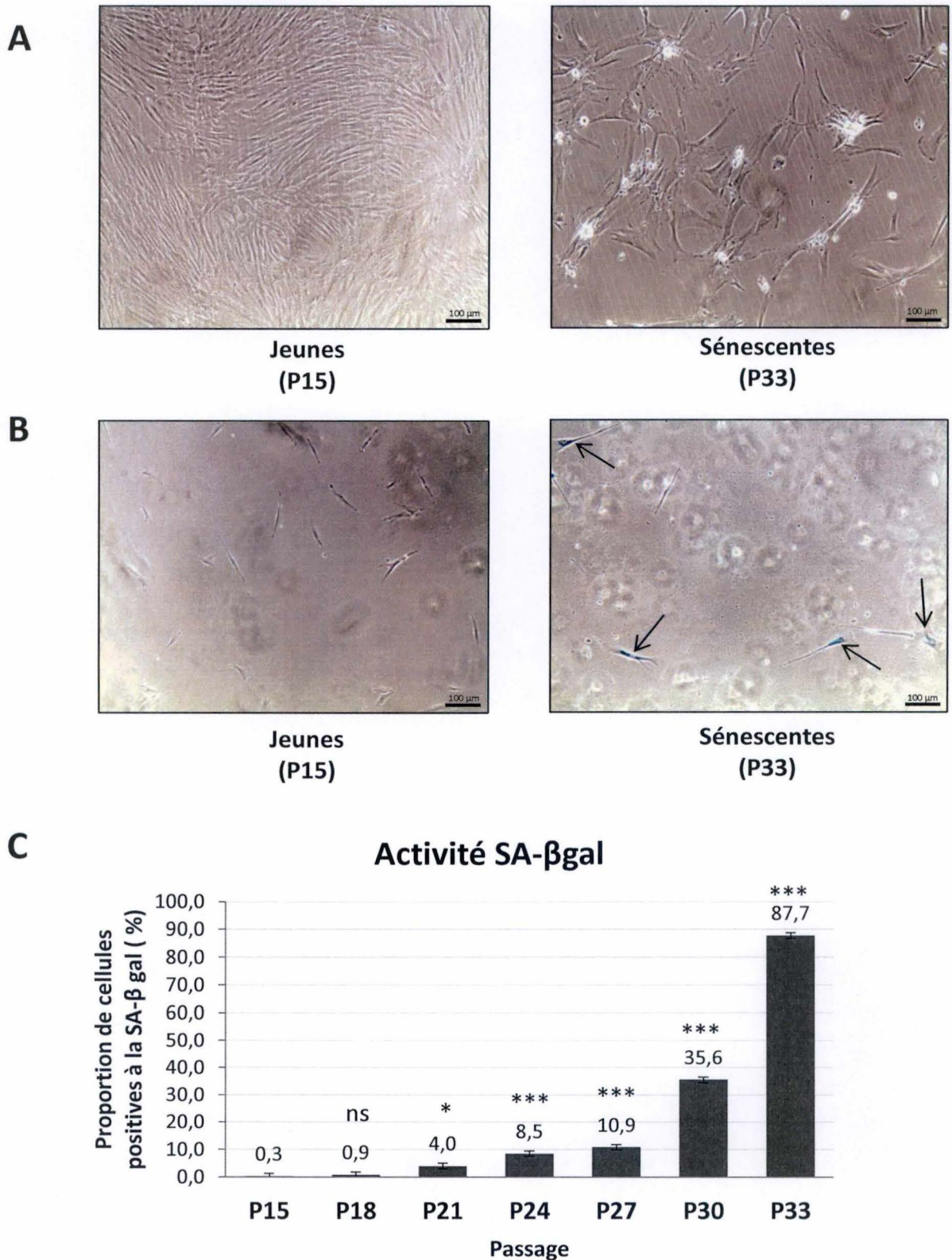
Le kit a été utilisé en suivant les instructions fournies par le fabricant. De manière brève, les cellules sont d'abord lysées grâce au tampon de lyse fourni par le kit. Le lysat cellulaire est ensuite dilué dans un tampon fourni par le kit et puis incubé toute la nuit à 4°C sur une membrane possédant les sondes spécifiques des récepteurs. Le lendemain, les membranes sont rincées trois fois grâce à une solution de rinçage et sont ensuite incubées une heure en présence d'un « cocktail d'anticorps » de détection. Les cellules sont de nouveau rincées et



puis incubées avec la HRP couplée à la streptavidine. Après cela, la détection peut se faire grâce à l'ajout du LumiGLO® et des réactifs du peroxyde, en chémoluminescence.

## **2.9. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel SigmaPlot en utilisant un test *ANOVA* 1 (NS : non significatif ; \* :  $0,05 > P > 0,01$  ; \*\* :  $0,01 > P > 0,001$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$ ).



**Figure 21: Evaluation de la morphologie et de la proportion de cellules positives à la SA-βgal au cours de la sénescence répllicative.** **A.** Photos de fibroblastes jeunes (P15) et sénescents (P33) prises grâce à un microscope à contraste de phase (agrandissement 100 X). **B.** Photos de fibroblastes après une coloration SA-βgal. Les cellules jeunes (P15) et sénescents (P33) sont visualisées grâce à un microscope à contraste de phase et les photos sont prises 16 heures après la coloration SA-βgal (agrandissement 100 x). Les cellules positives pour la SA-βgal, colorées en bleu, sont indiquées par les flèches. **C.** Proportion de fibroblastes positifs pour l'activité SA-βgal à différents passages. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives pour l'activité SA-βgal sur un nombre total d'environ 400 cellules comptées. Les résultats sont exprimés en moyenne de triplicats  $\pm$  écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel SigmaPlot® en utilisant un test ANOVA 1 (ns = non significatif ( $P > 0,05$  ; \* =  $0,05 > P > 0,01$  ; \*\* =  $0,01 > P > 0,001$  ; \*\*\* =  $P < 0,001$  ; par rapport à P15).



## **3. Résultats**

### **3.1. Biomarqueurs de sénescence**

Afin d'étudier les biomarqueurs de la sénescence, une culture cellulaire de fibroblastes humains de derme a été suivie sur plusieurs mois, d'un passage précoce (P15) à un passage tardif (P33), afin d'étudier l'évolution des biomarqueurs de sénescence au cours des passages. Nous avons choisi d'étudier trois marqueurs de la sénescence dans cette culture : la morphologie des cellules, l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence et l'expression de p16<sup>INK-4A</sup>. Ce sont en effet des marqueurs robustes de la sénescence, qui ont été définis dans plusieurs types cellulaires et dont la présence est également détectée pendant le vieillissement *in vivo*.

#### **3.1.1. Morphologie des fibroblastes au cours de la sénescence**

Les fibroblastes jeunes sont des cellules allongées et fusiformes. Au cours de la sénescence répliquative, les fibroblastes adoptent une morphologie différente. Ils deviennent plus grands et s'étalent dans la boîte de culture. Nous avons observé ce changement de morphologie entre les passages précoces et tardifs (**Figure 21 A**).

#### **3.1.2. Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence**

Afin d'évaluer la proportion de cellules sénescents dans notre culture cellulaire, des tests SA- $\beta$ gal ont été réalisés. La quantification du nombre de cellules positives pour la SA- $\beta$ gal est réalisée en comptant le nombre de cellules bleues (sénescents) et en réalisant un ratio par rapport au nombre de cellules totales (**Figure 21 B**). Nous observons que la proportion de cellules sénescents augmente avec le nombre de passages cellulaires (**Figure 21 C**).

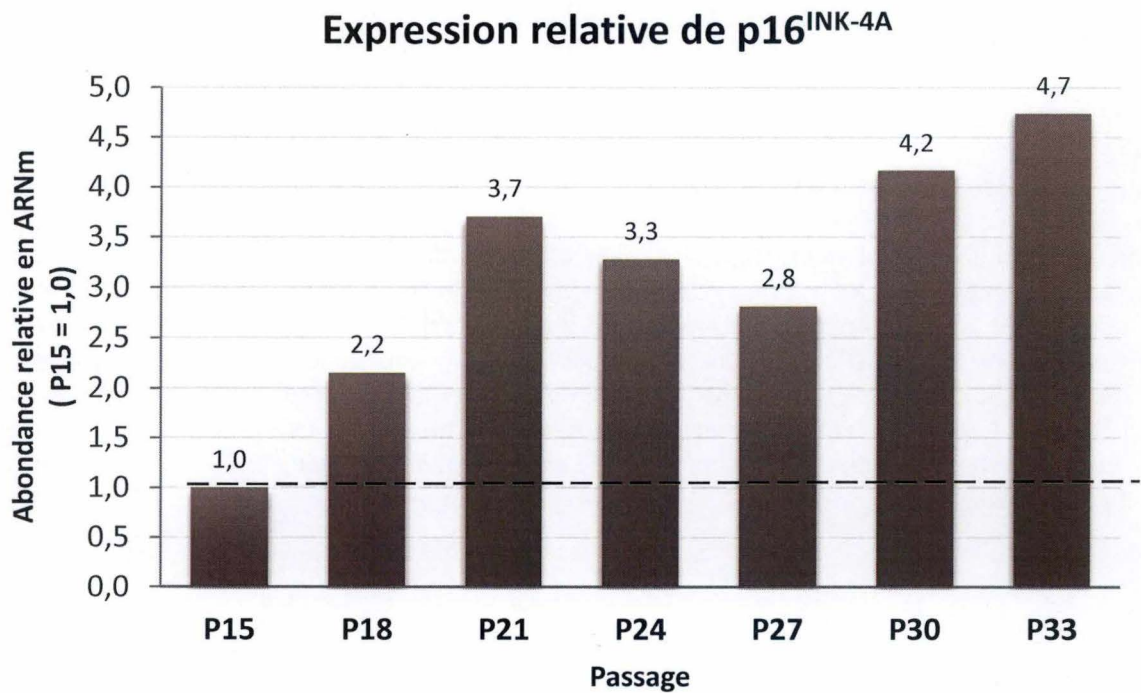
Le pourcentage d'activité SA- $\beta$ gal est faible (0,3 %) pour les cellules en passage précoce (Passage 15) et augmente au cours des passages, jusqu'à atteindre une augmentation plus marquée lors des derniers passages pour atteindre un haut pourcentage (87,7 %) pour les cellules en fin de vie proliférative (Passage 33).

Dans la présentation de nos résultats, nous indiquerons toujours le pourcentage de cellules positives à la SA- $\beta$ gal des cellules utilisées. En effet, les expériences ayant été réalisées sur plusieurs cultures indépendantes, il est nécessaire de quantifier la proportion des cellules sénescents des cultures utilisées afin de confirmer qu'il s'agit de fibroblastes jeunes ou sénescents. Nous avons choisi d'utiliser le test SA- $\beta$ gal pour sa facilité d'utilisation.

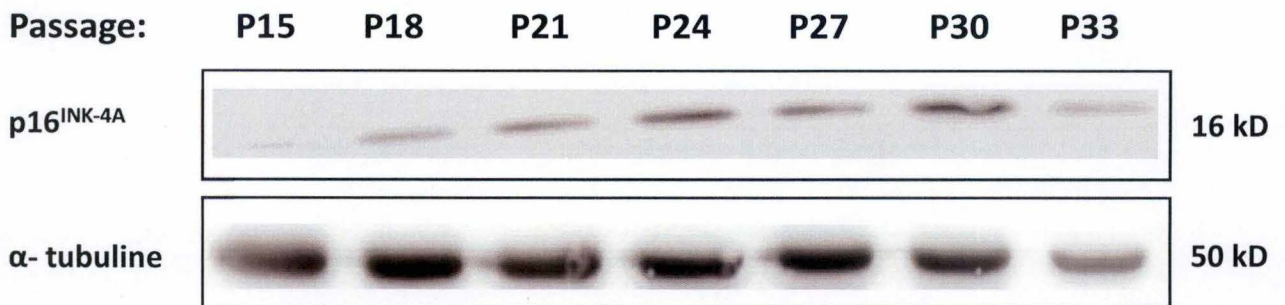
#### **3.1.3. Expression de p16<sup>INK-4A</sup>**

p16<sup>INK-4A</sup> est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, dont l'effet est de stopper la progression dans le cycle cellulaire. Nous avons choisi d'étudier son expression tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique.

**A**

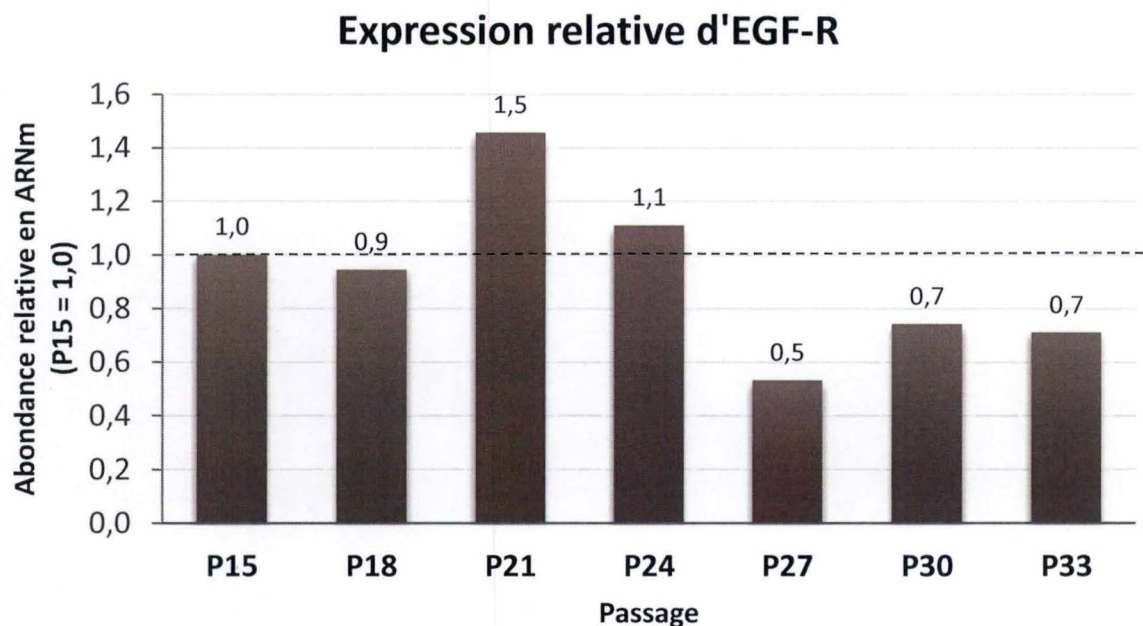
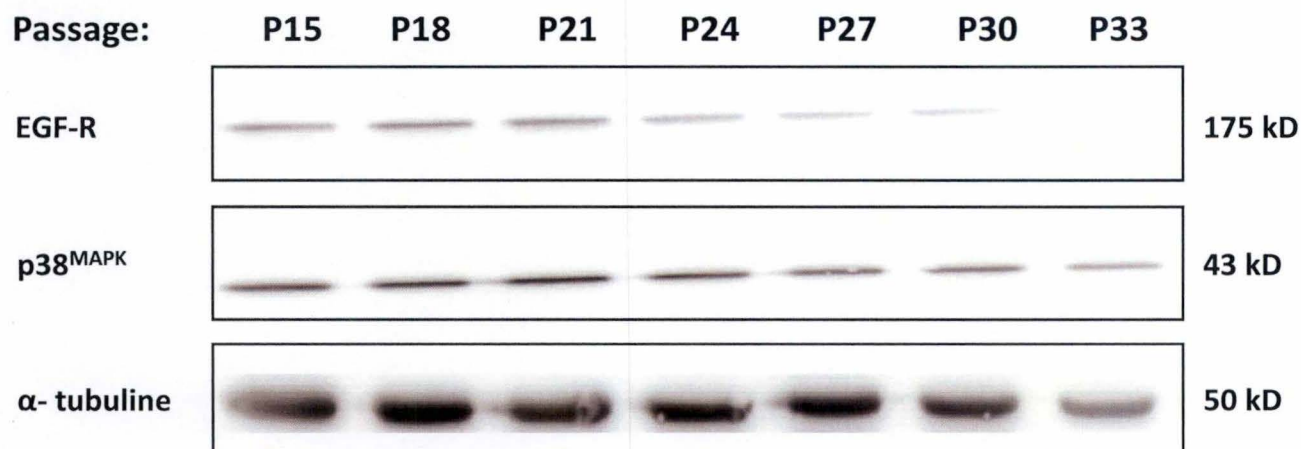


**B**



**Figure 22: Expression de p16<sup>INK-4A</sup> dans des fibroblastes au cours de la sénescence répliative.** Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre la sénescence répliative et des extractions d'ARN et de protéines ont été réalisées tous les 3 passages. **A.** Niveau d'ARNm de p16<sup>INK-4A</sup>. Une PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthodes. GAPDH est utilisé en tant que gène de référence. Les résultats sont exprimés en tant qu'abondance relative en ARNm de p16<sup>INK-4A</sup> en comparaison avec les cellules au passage 15. **B.** Abondance protéique de p16<sup>INK-4A</sup> par analyse en Western blot. L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.



**A****B**

**Figure 23: Expression d'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> au cours de la sénescence répliative.** Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre la sénescence répliative et des extractions d'ARN et de protéines ont été réalisées tous les 3 passages. **A.** Niveau d'ARNm d'EGF-R. Une PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthodes. GAPDH est utilisé en tant que gène de référence. Les résultats sont exprimés en tant qu'abondance relative en ARNm d'EGF-R en comparaison avec les cellules au passage 15 (=CTL). **B.** Abondance protéique d'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> par analyse en Western blot. L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

L'ARN des cellules a été extrait tous les trois passages et puis rétro-transcrit en ADNc enfin de réaliser des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel (RT-qPCR) pour évaluer le niveau d'expression de p16<sup>INK-4A</sup> dans les fibroblastes (**Figure 22 A**). Les résultats montrent que l'expression de p16<sup>INK-4A</sup> augmente de manière modérée du passage 15 jusqu'au passage 27 (de 1,0 pour le passage 15 à 2,8 X pour le passage 27). L'expression de p16<sup>INK-4A</sup> augmente plus fortement dans les derniers passages (4,2 X pour le passage 30 et 4,7 X pour le passage 33).

Les protéines ont également été extraites tous les trois passages afin de réaliser une analyse de l'expression de p16<sup>INK-4A</sup> grâce à la technique du Western blot (**Figure 22 B**). Les résultats obtenus semblent confirmer ceux obtenus par l'analyse en RT-qPCR puisque l'expression de la protéine p16 semble augmenter avec le nombre de passages.

Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S1.

L'analyse de ces trois biomarqueurs de la sénescence permet de confirmer que la présence de cellules sénescents augmente graduellement avec le nombre de passages cellulaires, atteignant un maximum au passage le plus élevé.

### 3.2. Expression du récepteur à l'EGF au cours de la sénescence

La voie de signalisation dépendante de l'EGF-R étant activée chez les kératinocytes suite à une perturbation des radeaux lipidiques, nous avons souhaité étudier l'expression du récepteur à l'EGF (EGF-R) lors de la sénescence et étudier l'activation de cette voie suite à une stimulation à l'EGF chez les fibroblastes.

Dans la littérature, il est décrit que les fibroblastes sénescents présentent un niveau d'expression d'EGF-R diminué (Shiraha et al., 2000). Nous avons voulu vérifier si cela était bien le cas dans les fibroblastes que nous avons cultivés. Afin d'étudier l'évolution de l'expression de l'EGF-R dans les fibroblastes humains de derme avec la sénescence, nous avons réalisé des extractions d'ARN et de protéines tous les trois passages cellulaires de notre culture jusqu'à la sénescence répliquative. Nous avons ensuite analysé l'expression de l'EGF-R par PCR semi-quantitative en temps réel et par Western blot.

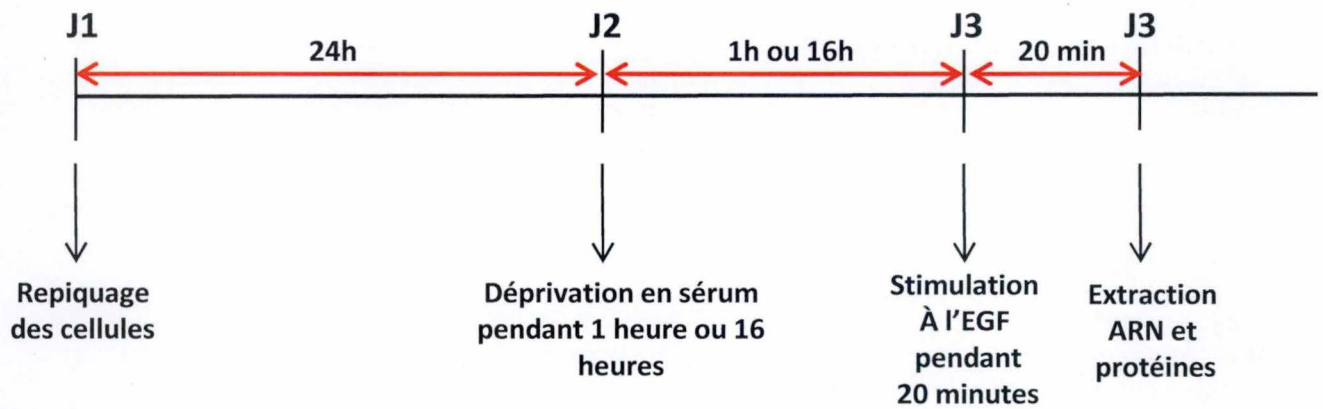
Le niveau d'ARNm de l'EGF-R est diminué dans les passages tardifs (0,5 pour P27 ; 0,7 pour P30 et 0,7 pour P33) (**Figure 23 A**). Le niveau d'expression de l'EGF-R semble diminuer de 30 % entre les cellules en passage précoce (P15) et les cellules en passage tardif (P33).

Le niveau protéique de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> ont été étudiés par Western blot afin d'évaluer leur niveau d'expression au cours de la sénescence répliquative (**Figure 23 B**). Les résultats obtenus pour l'EGF-R confirment ceux obtenus par PCR semi-quantitative en temps réel : il y a une diminution de l'expression de l'EGF-R dans les passages tardifs (P27 ; P30 et P33).

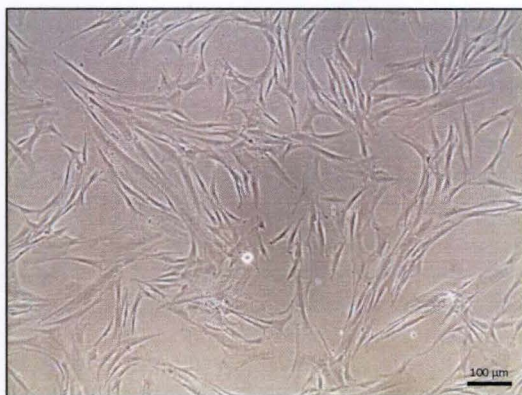
Il semble que p38<sup>MAPK</sup> subisse également une diminution de son expression dans les passages tardifs, mais elle est moins marquée.

Ces résultats confirment que l'expression du récepteur à l'EGF diminue avec le nombre de passages cellulaires et donc avec la sénescence répliquative.

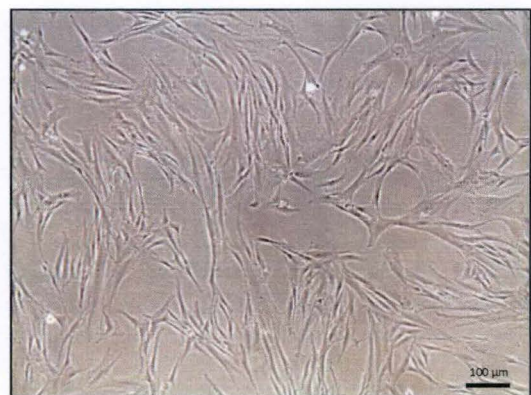




**Figure 24: Représentation schématique du protocole de stimulation à l'EGF.** Les fibroblastes sont repiqués 24h avant d'être déprivés en sérum pendant 1 heure ou 16 heures, afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R. Les fibroblastes sont ensuite stimulés avec de l'EGF pendant 20 minutes puis les cellules sont lysées afin d'en extraire l'ARN ou les protéines.

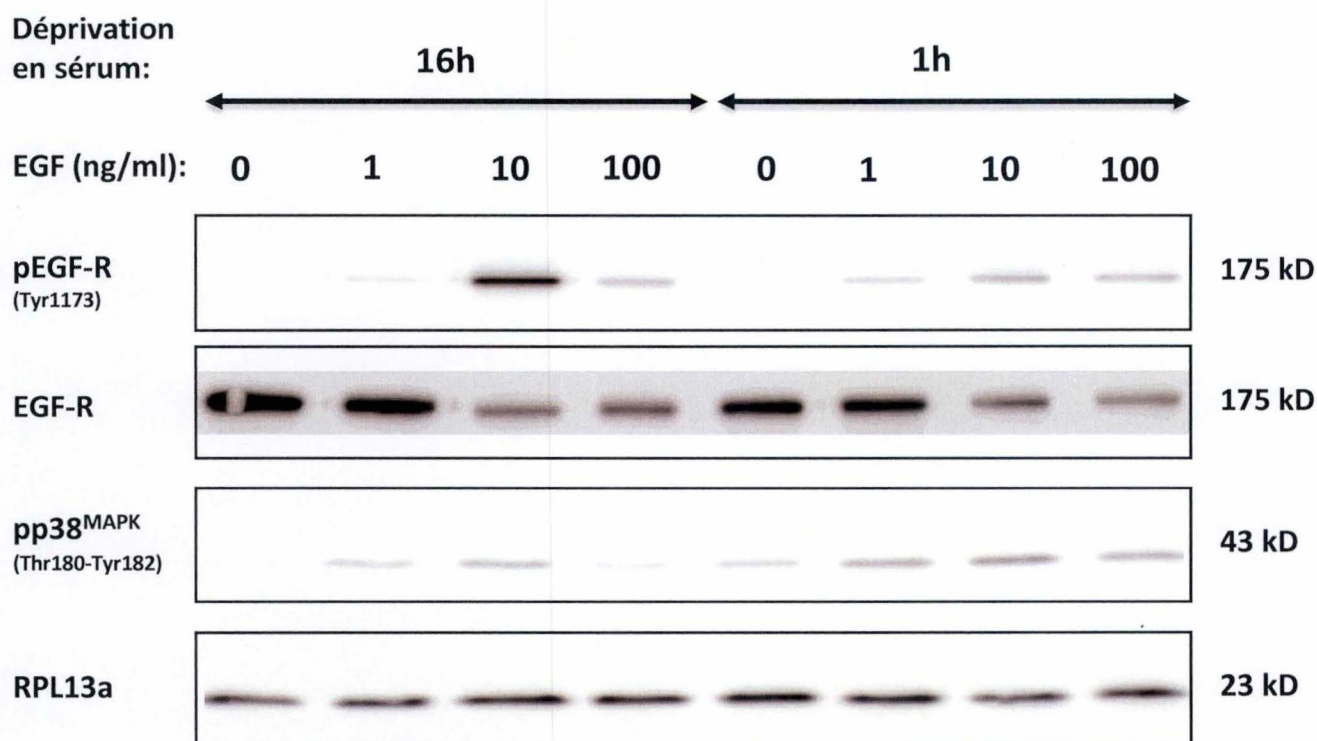


CTL



EGF

**Figure 25: Effet d'une stimulation à l'EGF sur des fibroblastes jeunes.** Photos de fibroblastes (P27, 3,0 % SA-βgal +) stimulés ou non avec de l'EGF à 10 ng/ml pendant 20 minutes. Les photos sont prises grâce à un microscope à contraste de phase (agrandissement 100 X).



**Figure 26: Analyse de l'abondance protéique des formes phosphorylées et totales de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes jeunes.** Des fibroblastes jeunes (P24, 8,5 % SA-βgal +) sont ensemencés à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, les cellules sont déprivées en sérum pendant 1 heure ou 16 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R. Elles sont ensuite stimulées avec différentes concentrations d'EGF (1 ng/ml; 10 ng/ml ou 100 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF (0 ng/ml). La détection de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R et de pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est réalisée par Western blot. RPL13a est utilisé comme contrôle de charge.



Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S2.

### **3.3. Stimulation avec de l'EGF**

#### **3.3.1. Protocole**

Afin d'étudier l'effet d'une stimulation avec de l'EGF sur les fibroblastes, nous avons mis au point un protocole spécifique. Celui-ci début au jour 1 par le repiquage des cellules à une densité cellulaire précise afin d'éviter des variations dues à la confluence. Le deuxième jour, les cellules sont déprivées en sérum pendant 1 heure ou 16 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R dans le milieu de culture. Le troisième jour, les fibroblastes sont stimulés avec de l'EGF et l'ARN et/ou les protéines sont directement extraits après la stimulation (**Figure 24**).

#### **3.3.2. Morphologie des fibroblastes**

Afin de vérifier la morphologie des cellules suite à une stimulation avec de l'EGF, nous avons pris des photos après chaque stimulation et les avons comparées avec les photos des cellules contrôles. Les photos sont prises grâce à un microscope à contraste de phase, avec un agrandissement de 100 X. Les photos obtenues montrent qu'une stimulation avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml et pendant 20 minutes ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie des fibroblastes (**Figure 25**).

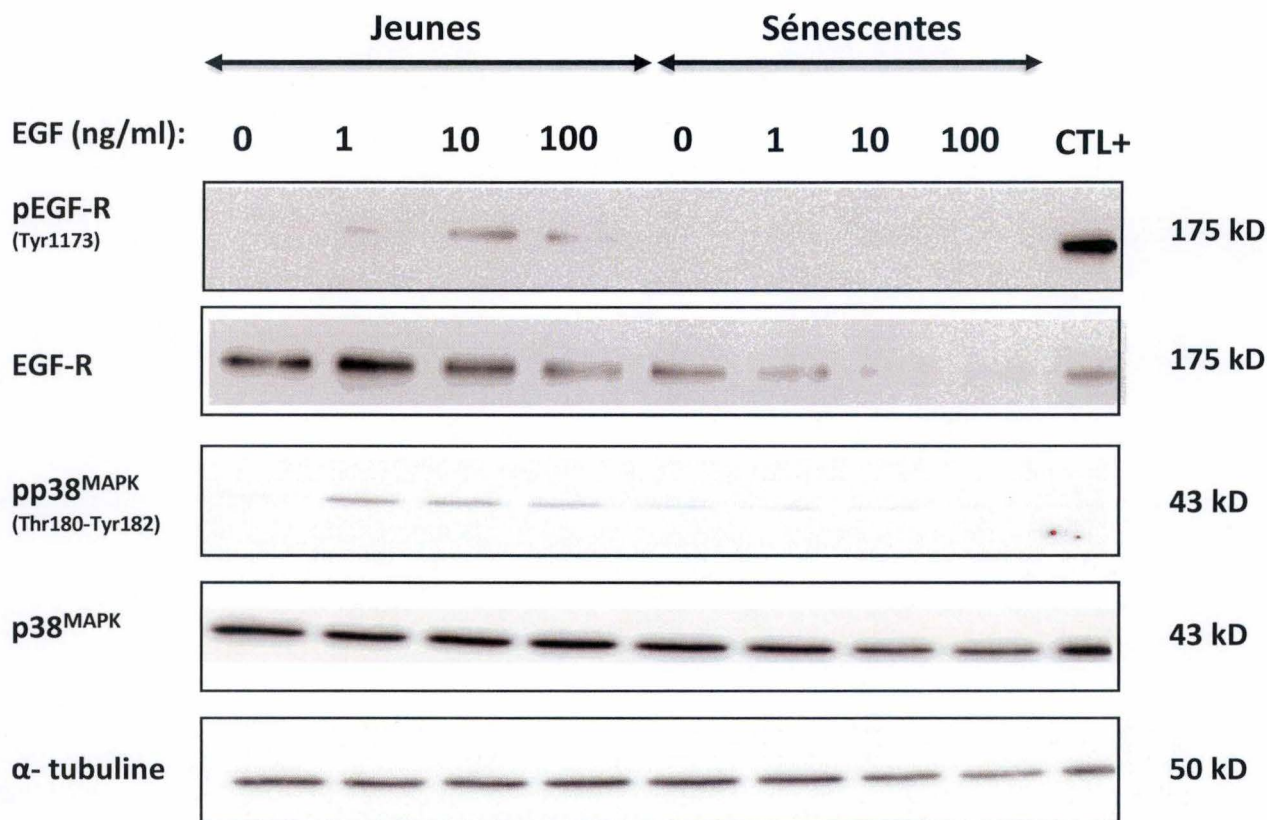
#### **3.3.3. Au niveau protéique**

##### **3.3.3.1. Effet de la durée de déprivation en sérum**

Afin de caractériser les meilleures conditions pour activer la voie de l'EGF-R et donc induire une phosphorylation de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> dans les fibroblastes, nous avons utilisé des fibroblastes jeunes (P24 ; 8,5 % de cellules SA- $\beta$ gal +) et les avons déprivés en sérum pendant 1 heure ou 16 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite stimulées avec des doses croissantes d'EGF (1, 10 ou 100 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF (0 ng/ml).

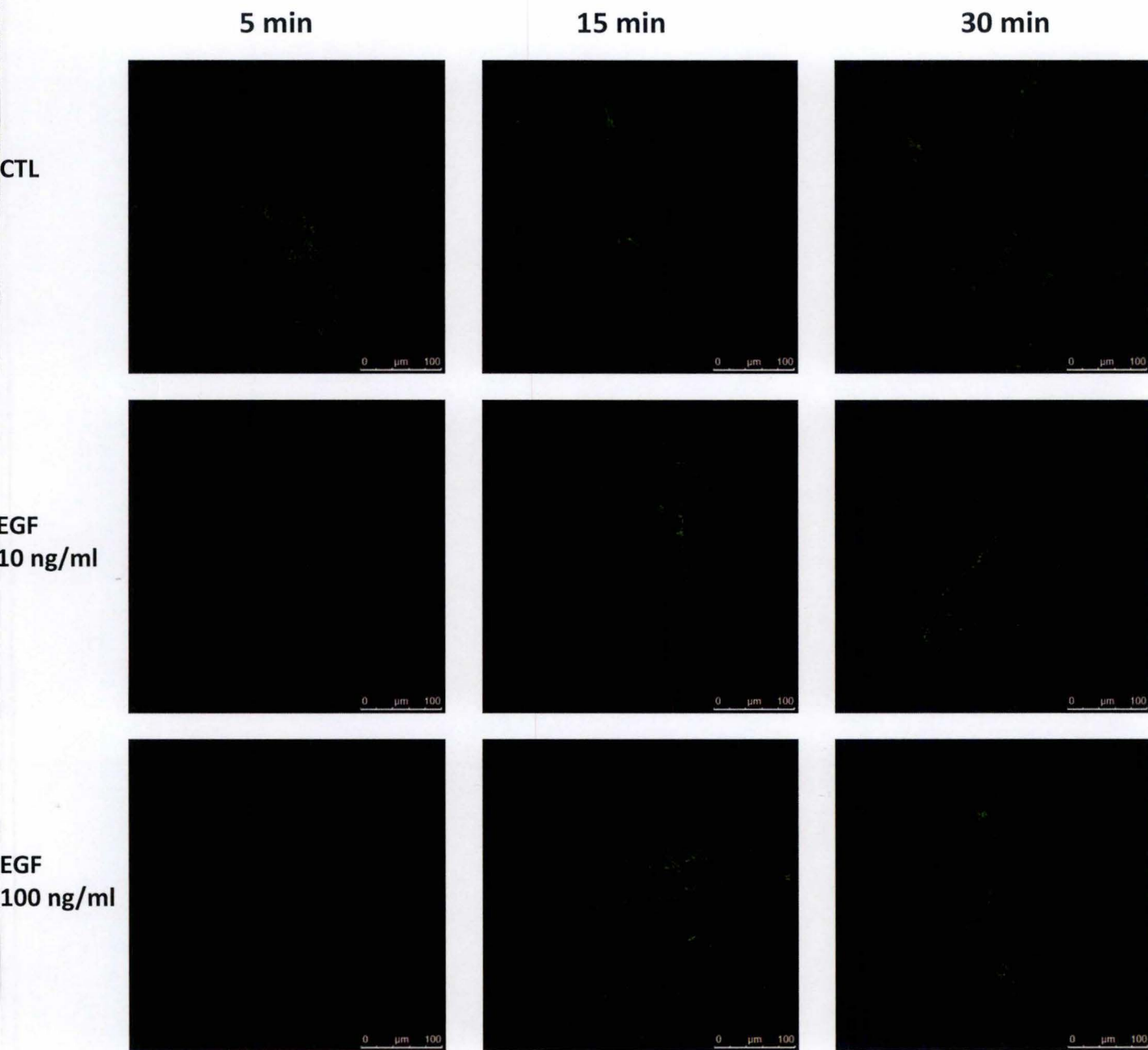
Des extractions protéiques sont réalisées et les formes totale et phosphorylée de l'EGF-R (Tyr1173) et la forme phosphorylée de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) sont analysées par Western blot.

Les résultats montrent que la meilleure condition afin d'activer le récepteur à l'EGF dans les fibroblastes est une déprivation en sérum d'une durée de 16 heures suivie par une stimulation avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes (**Figure 26**).



**Figure 27: Analyse de l'abondance protéique des formes phosphorylées et totales de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes jeunes et chez des fibroblastes sénescents.** Les cellules jeunes (P27; 3% SA-βgal +) et sénescents (P33, 80% SA-βgal +) sont ensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> ou 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> respectivement dans du milieu BME complet. Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec différentes concentrations d'EGF (1 ng/ml; 10 ng/ml ou 100 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. Des extractions protéiques et des analyses en Western blot sont réalisées afin de déterminer l'abondance protéique de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R, pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et p38<sup>MAPK</sup>. Le contrôle positif correspond à des fibroblastes jeunes déprivés pendant 16 heures en sérum et stimulés avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes. L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.





**Figure 28: Localisation de l'EGF-R par immunofluorescence dans des fibroblastes jeunes après stimulation avec de l'EGF.** Des fibroblastes jeunes (P27; 9,6 % SA- $\beta$ gal +) sontensemencés à une densité de 11.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, ils sont déprivés en sérum pendant 4 heures puis stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml ou 100 ng/ml pendant 5, 15 ou 30 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. La localisation de l'EGF-R est réalisée par immunofluorescence en utilisant un anticorps reconnaissant la forme totale de l'EGF-R (en vert).

Ces conditions de stimulation serviront de contrôle positif dans les prochaines expériences.

Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S3.

### 3.3.3.2. Comparaison de la réponse entre cellules jeunes et sénescents

Nous avons ensuite voulu comparer l'effet d'une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes jeunes (P27 ; 3,3 % SA- $\beta$ gal +) et des fibroblastes sénescents (P33 ; 79,6 % SA- $\beta$ gal +). Les fibroblastes sont déprivés en sérum pendant 16 heures puis stimulés avec des doses croissantes d'EGF (1, 10 ou 100 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF (0 ng/ml). Les formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) sont ensuite analysées, ainsi que les formes totales de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup>. L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats montrent que chez les fibroblastes jeunes, une phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est visible après une stimulation avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml (**Figure 27**). Chez les fibroblastes sénescents, en revanche, aucune phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) n'a été détectée. Nous avons également mis en évidence une diminution de l'abondance de la forme totale de l'EGF-R chez ces fibroblastes sénescents.

Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S4.

### 3.3.4. Localisation du récepteur à l'EGF par immunofluorescence

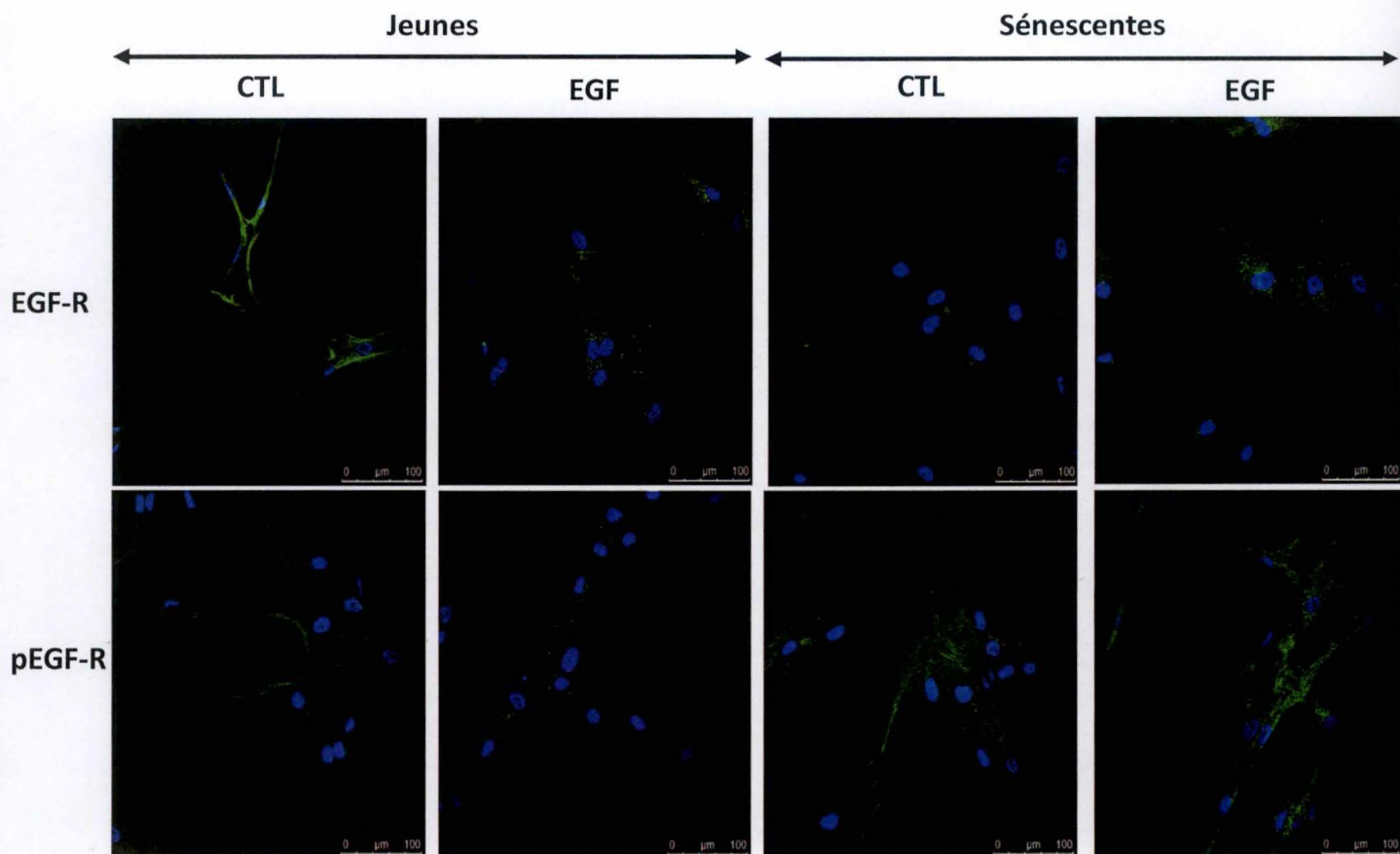
Selon la littérature, le récepteur à l'EGF est internalisé suite à son activation (Zwang and Yarden, 2006), afin d'être dégradé dans les lysosomes ou bien d'être recyclé en surface de la cellule. Nous avons étudié la localisation de l'EGF-R après une stimulation des fibroblastes avec de l'EGF par immunofluorescence.

#### 3.3.4.1. Effet du temps de stimulation

Des fibroblastes jeunes (P27 ; 9,6 % SA- $\beta$ gal +) sont déprivés en sérum pendant 4 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R (Rem : le temps de déprivation a été diminué à 4 heures car les cellules cultivées sur couvre-objets sont plus sensibles à cette déprivation). Ils sont ensuite stimulés avec différentes concentrations d'EGF (10 ou 100 ng/ml) pendant différents temps (5, 15 ou 30 minutes). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. Immédiatement après la stimulation, les cellules sont fixées et incubées avec les anticorps afin de localiser l'EGF-R dans les fibroblastes.

Les résultats montrent que sans stimulation, le récepteur à l'EGF est localisé en membrane mais également de manière diffuse dans le cytoplasme (**Figure 28**). Il en va de même pour une stimulation d'une durée de 5 minutes, que ce soit avec de l'EGF utilisé à une concentration de 10 ng/ml ou 100 ng/ml. En revanche, les fibroblastes stimulés pendant 15 et 30 minutes, avec 10 et 100 ng/ml, voient la localisation de leur EGF-R modifiée. En effet, le marquage est plus marqué au niveau du cytoplasme, avec un marquage « en points » dans les





**Figure 29: Localisation d'EGF-R et de pEGF-R (Tyr1173) par immunofluorescence après un traitement avec de l'EGF.** Des fibroblastes jeunes (P32; 20,6 % SA-βgal +) et sénescentes (P38; 88,9 % SA-βgal +) sont ensemencés à une densité de 11.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, ils sont déprivés en sérum pendant 4 heures puis traités avec de l'EGF (10 ng/ml) pendant 20 min. Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. L'EGF-R et pEGF-R (Tyr1173) ont été localisés par immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques (en vert). Les noyaux ont été colorés par le TO-PRO3 (en bleu).

régions péri-nucléaires, signifiant un regroupement probable des récepteurs à l'EGF ainsi que leur internalisation.

#### 3.3.4.2. Comparaison de la réponse entre cellules jeunes et sénescents

Après avoir mis en évidence l'internalisation de l'EGF-R chez des fibroblastes jeunes après une stimulation avec de l'EGF, nous avons comparé l'internalisation de l'EGF-R après une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes jeunes et sénescents. Pour ce faire, les fibroblastes pré-sénescents (P32 ; 20,6 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P38 ; 88,9 % SA- $\beta$ gal +) sont déprivés en sérum pendant 4 heures puis stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. Immédiatement après la stimulation, les fibroblastes sont fixés et incubés avec les anticorps correspondants à la forme totale de l'EGF-R ou la forme phosphorylée de l'EGF-R (Tyr1173).

Les résultats montrent que sans stimulation, on détecte le récepteur en membrane et dans le cytoplasme, aussi bien pour les cellules jeunes que sénescents. Quand les fibroblastes sont stimulés avec de l'EGF, il y a internalisation et un regroupement en « points » du récepteur, aussi bien pour les cellules jeunes que pour les cellules sénescents. Cette observation est également valable pour la forme phosphorylée de l'EGF-R (Tyr1173) : des regroupements du récepteur activé sont observés en cas de stimulation avec de l'EGF chez les fibroblastes pré-sénescents et sénescents (**Figure 29**).

Ces résultats nous permettent de confirmer l'internalisation du récepteur à l'EGF après une stimulation avec de l'EGF, aussi bien dans des fibroblastes pré-sénescents que dans des fibroblastes sénescents.

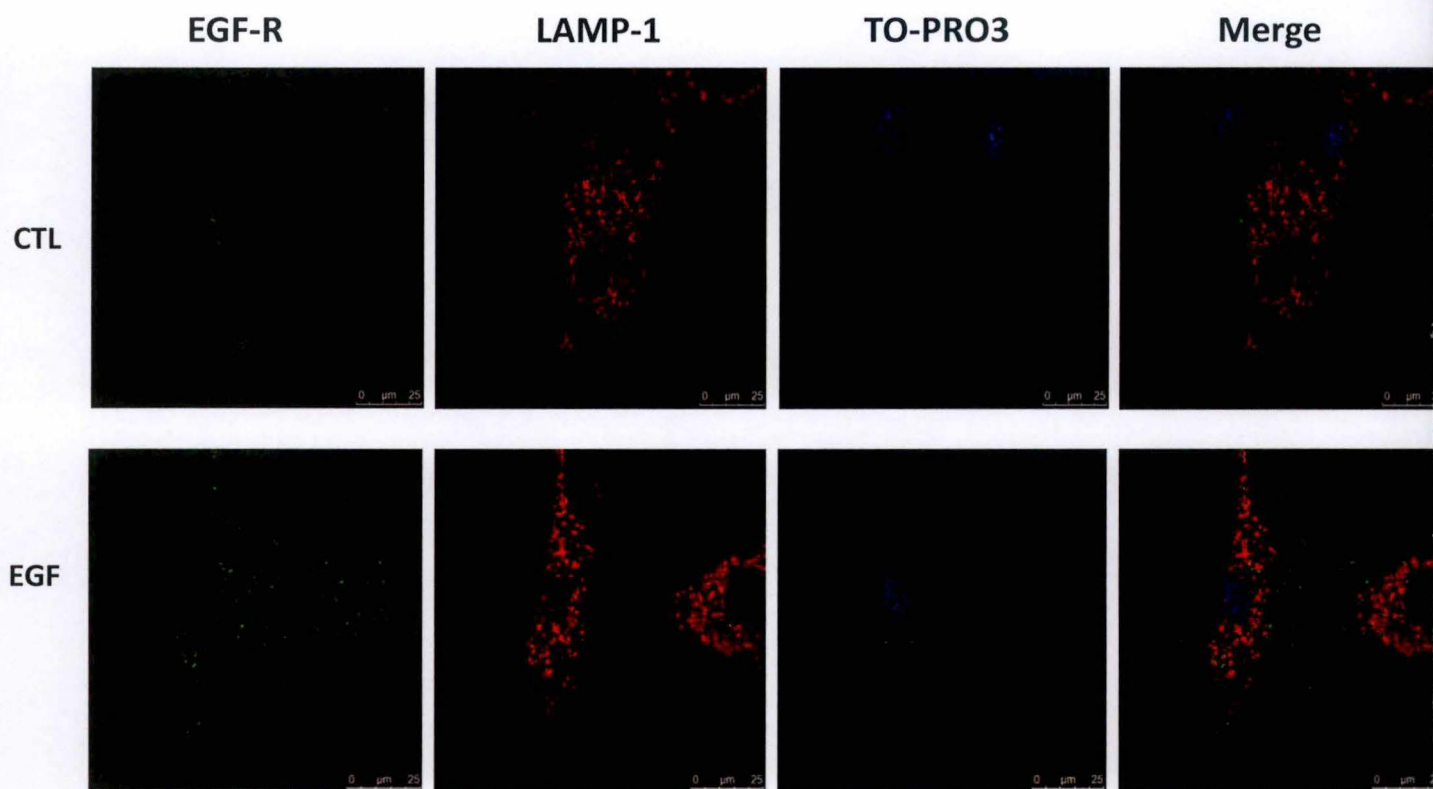
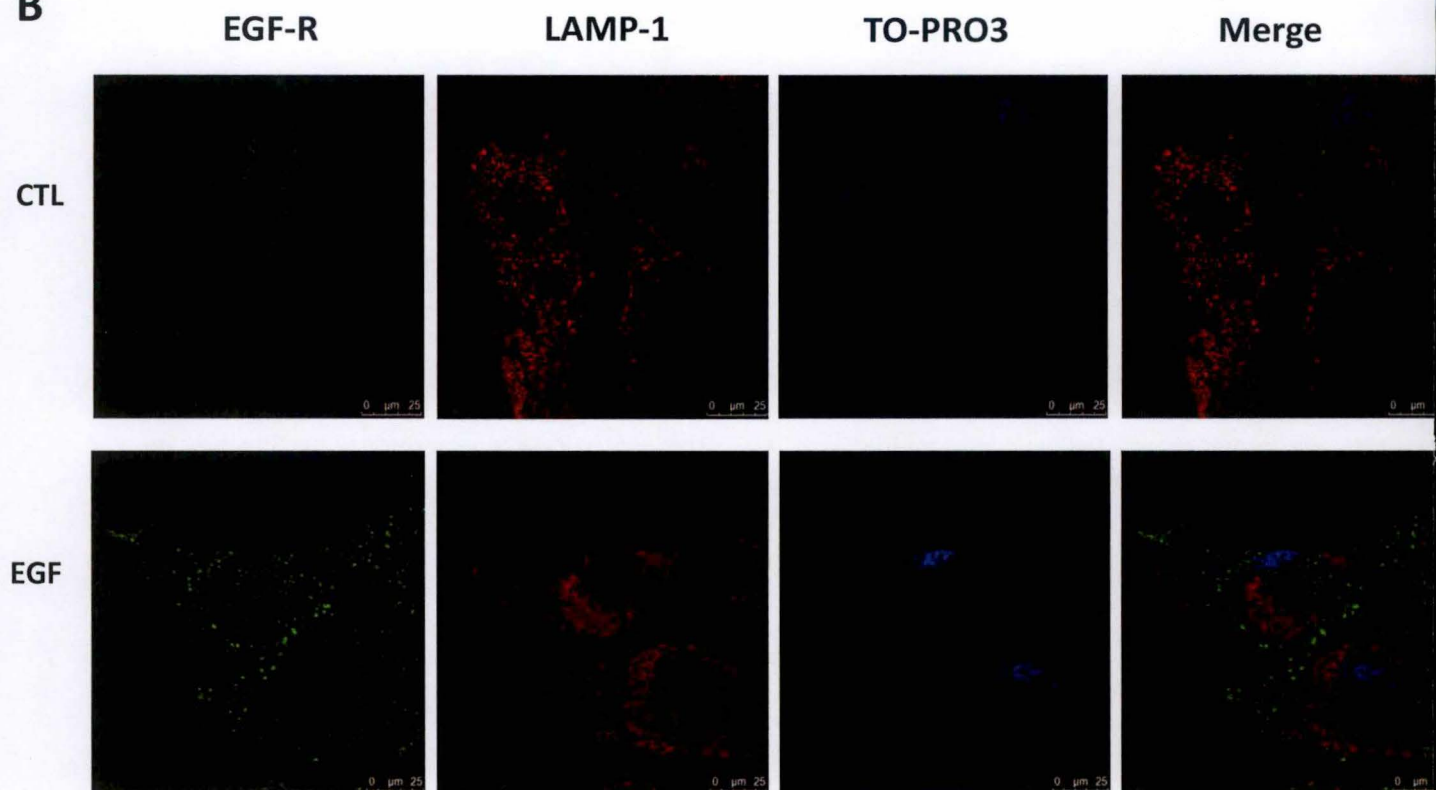
#### 3.3.4.3. Colocalisation avec LAMP-1

Dans certains cas, l'EGF-R est internalisé et dégradé dans les lysosomes après son activation. Il est possible de mettre en évidence cette dégradation dans les lysosomes via une immunofluorescence dans laquelle l'EGF-R et LAMP-1, une protéine spécifique des lysosomes, sont marqués. Le double marquage permet ensuite de vérifier une éventuelle colocalisation entre l'EGF-R et LAMP-1, ce qui signifierait que l'EGF-R est probablement dégradé dans les lysosomes.

Afin d'étudier le devenir de l'EGF-R après une stimulation avec de l'EGF dans les fibroblastes, nous avons réalisé une immunofluorescence marquant à la fois l'EGF-R et LAMP-1 afin de vérifier une éventuelle colocalisation entre ces deux protéines. Cela a été réalisé à la fois chez des fibroblastes jeunes et sénescents.

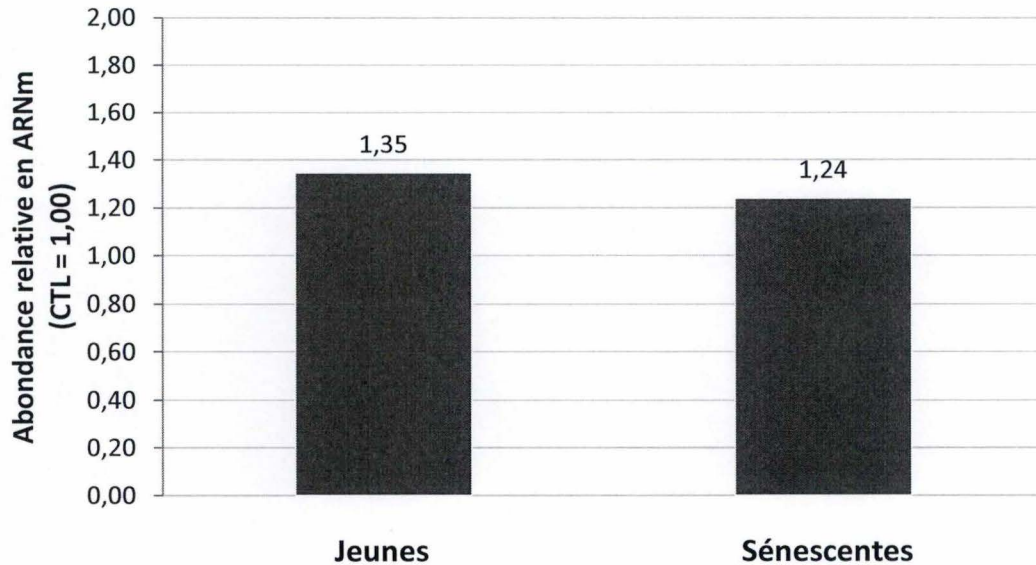
Des fibroblastes jeunes (P30 ; 7,0 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P41 ; 98,8 % SA- $\beta$ gal +) sont déprivés en sérum pendant 4 heures puis stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. Immédiatement après la stimulation, les fibroblastes sont fixés



**A****B**

**Figure 30: Etude de colocalisation entre EGF-R et LAMP-1 par immunofluorescence chez des fibroblastes jeunes (A) et sénescents (B) stimulés avec de l'EGF.** Des fibroblastes jeunes (P30; 7,0 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P41; 98,8 % SA- $\beta$ gal +) sont ensemencés à une densité de 11.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, ils sont déprivés en sérum pendant 4 heures puis stimulés avec de l'EGF (10 ng/ml) pendant 20 min. Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions sans être stimulées avec de l'EGF. L'EGF-R et LAMP-1 ont été localisés par immunofluorescence en utilisant un anticorps reconnaissant la forme totale de EGF-R (en vert) et un anticorps reconnaissant LAMP-1 (en rouge). Les noyaux ont été colorés par le TO-PRO3 (en bleu).

### Expression relative d'EGF-R après stimulation à l'EGF



**Figure 31: Niveau d'expression de l'EGF-R après une stimulation avec de l'EGF.** Niveau d'ARNm d'EGF-R. Les cellules jeunes (P30 ; 15,7 % SA- $\beta$ gal +) et sénescentes (P40 ; 90,9 % SA- $\beta$ gal +) sontensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> ou 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> respectivement dans du milieu BME complet. Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes. L'ARN des cellules est extrait et rétro-transcrit en ADNc puis une PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthodes. GAPDH est utilisé en tant que gène de référence. Les résultats sont exprimés en tant qu'abondance relative en ARNm d'EGF-R en comparaison avec des cellules contrôles (jeunes ou sénescentes) non traitées avec de l'EGF (= 1,00).



et incubés avec les anticorps correspondants à la forme totale de l'EGF-R et la protéine lysosomale LAMP-1. Les noyaux sont marqués avec l'agent intercalant TO-PRO3.

Les résultats montrent que les fibroblastes jeunes et sénescents internalisent le récepteur à l'EGF après une stimulation avec de l'EGF mais celui-ci ne semble pas être co-localisé avec LAMP-1, ce qui semble démontrer qu'à ce moment, il n'y a pas de dégradation de l'EGF-R au niveau du lysosome (**Figure 30**).

Ces résultats nous permettent de conclure que l'EGF-R n'est pas dégradé dans les lysosomes après une stimulation avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes. Notons que le temps de stimulation avec l'EGF est peut-être trop court que pour permettre le trafic du récepteur jusqu'aux lysosomes où il pourra être dégradé. Mais il se peut également que le récepteur ne soit pas dégradé et soit préférentiellement recyclé vers la surface des fibroblastes.

### **3.3.5. Au niveau transcriptionnel**

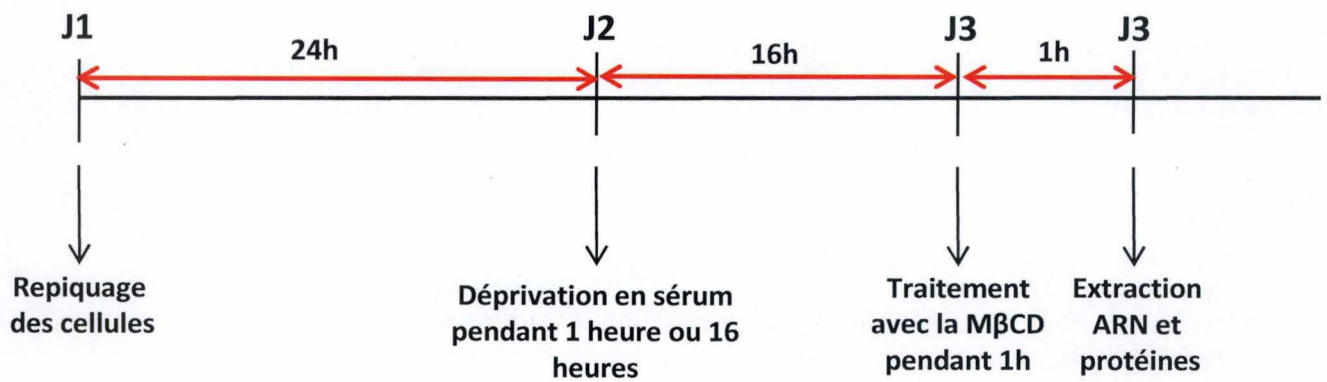
Maintenant qu'il a été démontré qu'une stimulation avec de l'EGF à 10 ng/ml pendant 20 minutes induisait l'activation de l'EGF-R via sa phosphorylation (Tyr1173), nous avons voulu étudier l'effet qu'avait une telle stimulation au niveau transcriptionnel.

Des fibroblastes jeunes (P31 ; 15,7 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P40 ; 90,9 % SA- $\beta$ gal +) sont déprivés en sérum pendant 16 heures puis stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes puis des extractions d'ARN sont réalisées. Ce dernier est ensuite rétro-transcrit en ADNc afin d'effectuer des PCR semi-quantitatives en temps réel pour évaluer le niveau d'expression de l'EGF-R dans les fibroblastes.

Les résultats montrent qu'une stimulation avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes augmente la transcription de l'EGF-R à la fois chez les cellules jeunes et chez les cellules sénescents. Cependant, l'augmentation de transcription est plus marquée chez les jeunes (1,35) que chez les sénescents (1,24) (**Figure 31**).

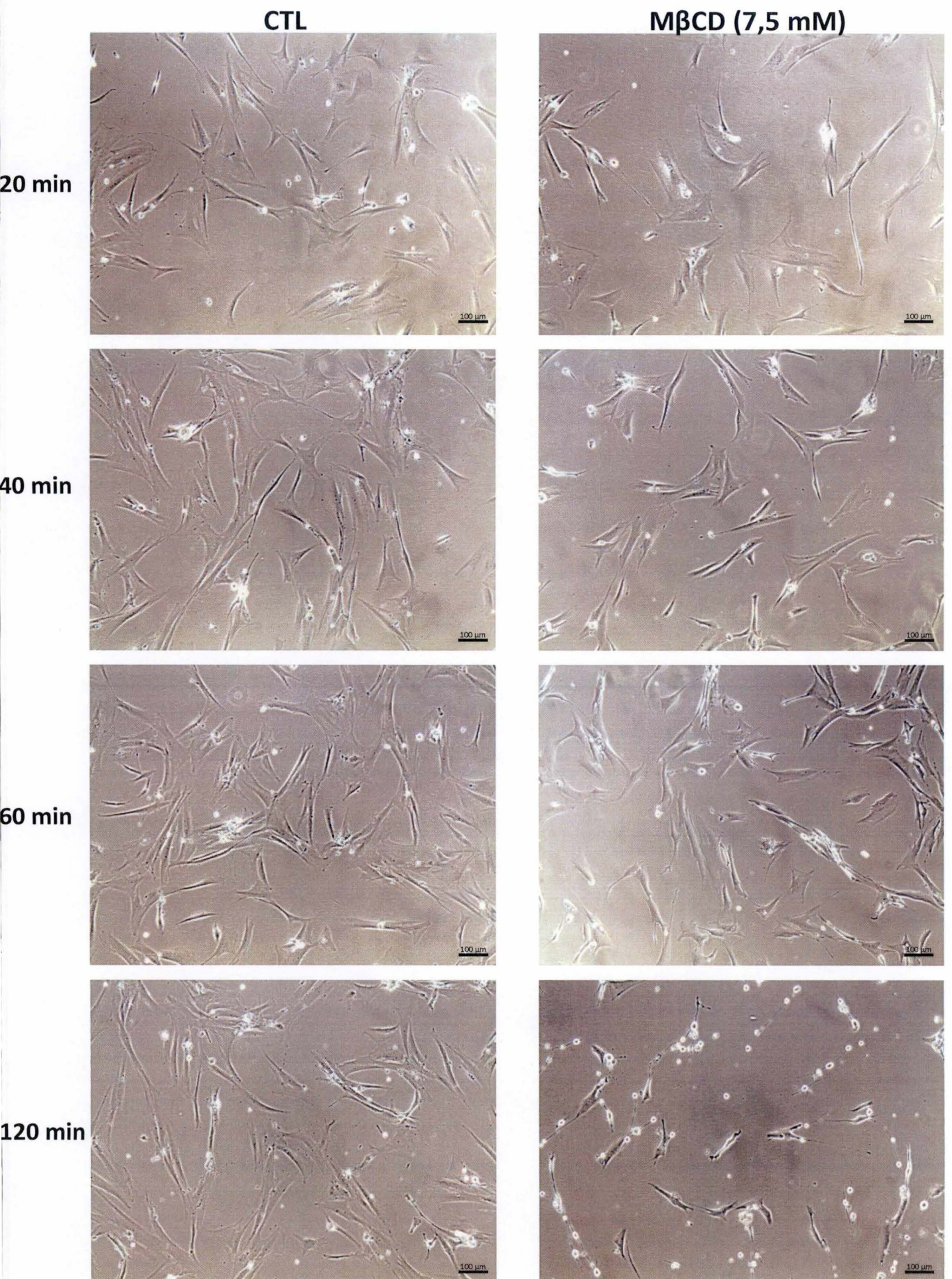
### **3.4. Déplétion en cholestérol**

Comme nous avons montré qu'une stimulation avec de l'EGF était capable d'induire une phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173), nous avons ensuite voulu étudier si une perturbation des radeaux lipidiques était capable d'activer également l'EGF-R, comme cela a été montré dans les kératinocytes. Afin de perturber les radeaux lipidiques, nous avons choisi d'utiliser un agent déplétant le cholestérol. Comme cela a été précisé dans l'introduction, de nombreux agents peuvent être utilisés afin de dépler le cholestérol membranaire et ainsi perturber l'intégrité des radeaux lipidiques. Tout au long de ce mémoire, nous avons choisi d'utiliser la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), notamment pour sa facilité d'utilisation mais aussi pour son efficacité déjà prouvée lors d'études chez des kératinocytes.



**Figure 32: Représentation schématique du protocole de traitement avec la MβCD.** Les fibroblastes sont repiqués 24h avant d'être déprivés en sérum pendant 1 heure ou 16 heures et sont ensuite traités avec de la MβCD pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite lysées afin d'en extraire l'ARN et/ou les protéines.





**Figure 33: Effet de la M $\beta$ CD sur la morphologie des fibroblastes.** Les fibroblastes jeunes (P28, 6,0 % SA- $\beta$ gal +) sontensemencés à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Ils sont ensuite déprivés en sérum pendant une durée de 16 heures puis traités avec de la M $\beta$ CD à 7,5 mM pendant 20, 40, 60 ou 120 minutes. Ils sont ensuite visualisés grâce à un microscope à contraste de phase (agrandissement 100 X).



### 3.4.1. Protocole

Afin d'étudier l'effet d'une déplétion en cholestérol via l'utilisation de la M $\beta$ CD, nous avons mis au point un protocole de traitement. Celui-ci débute au jour 1 par le repiquage des fibroblastes à une densité cellulaire précise afin d'éviter les variations dues à la confluence. Le deuxième jour, les cellules sont déprivées en sérum pendant 1 heure ou 16 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R dans le milieu de culture. Le troisième jour, les fibroblastes sont traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration variant entre 5 et 10 nM pendant 20, 40, 60 ou 120 minutes. Ensuite, l'ARN et/ou les protéines sont directement extraits après le traitement (**Figure 32**).

### 3.4.2. Effet de la M $\beta$ CD sur les fibroblastes

#### 3.4.2.1. Morphologie des fibroblastes

Afin d'étudier l'effet de la M $\beta$ CD sur la morphologie des fibroblastes, nous avons réalisé des photos en microscopie optique à contraste de phase des fibroblastes traités pendant différents temps avec de la M $\beta$ CD à 7,5 mM.

Si un temps de traitement entre 20 et 60 minutes ne semble pas avoir d'impact sur la morphologie des fibroblastes, un temps de traitement de 120 minutes montre des changements dans la morphologie des fibroblastes (**Figure 33**). Les fibroblastes paraissent rétractés lors de l'ajout de la M $\beta$ CD. Un temps de traitement de 120 minutes semble de plus induire la mort des fibroblastes.

#### 3.4.2.2. Dosage du contenu en cholestérol

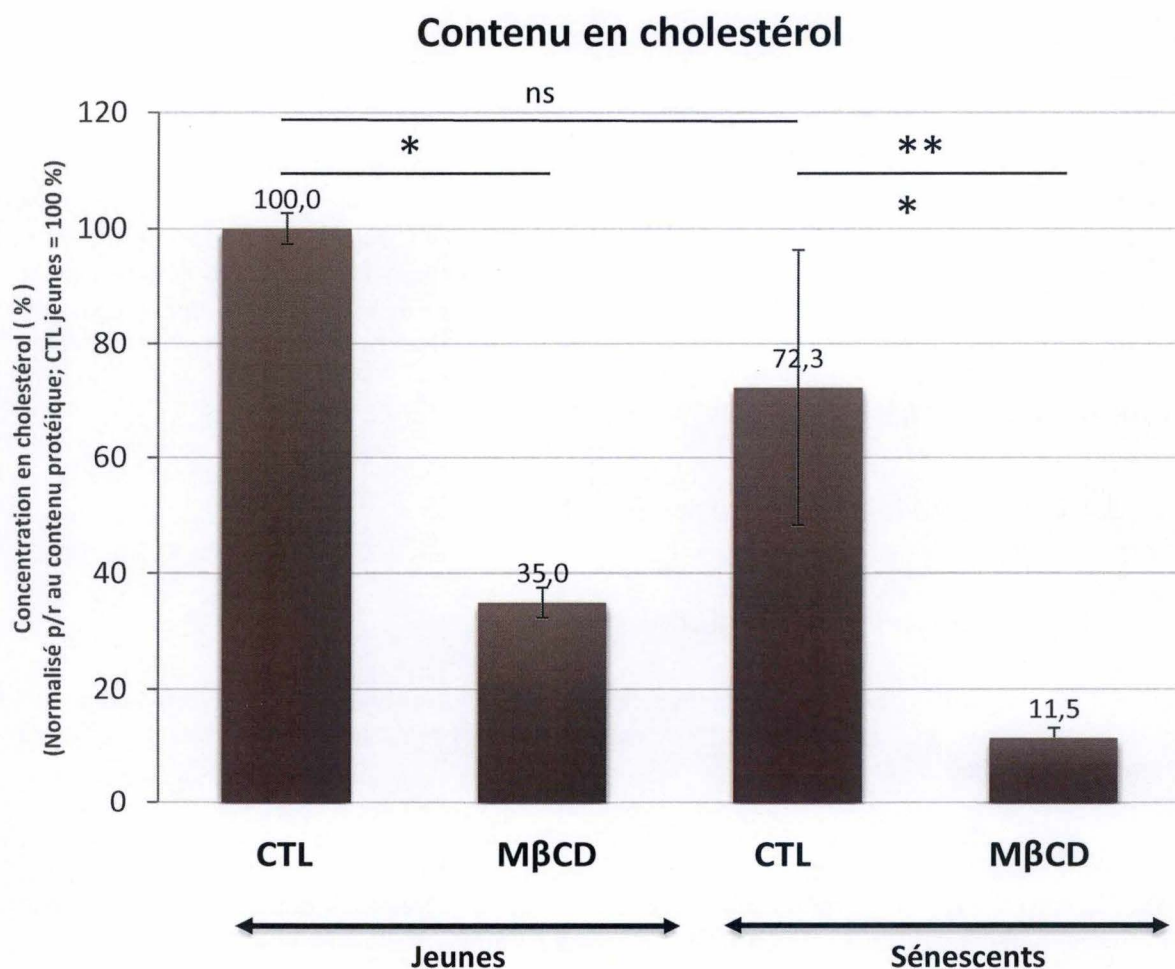
Afin de vérifier que la M $\beta$ CD réduisait le contenu en cholestérol de manière efficace dans les kératinocytes, nous avons réalisé un dosage du cholestérol et un marquage du cholestérol cellulaire par la filipine, dans des cellules traitées ou non avec de la M $\beta$ CD.

##### 3.4.2.2.1. Dosage du cholestérol

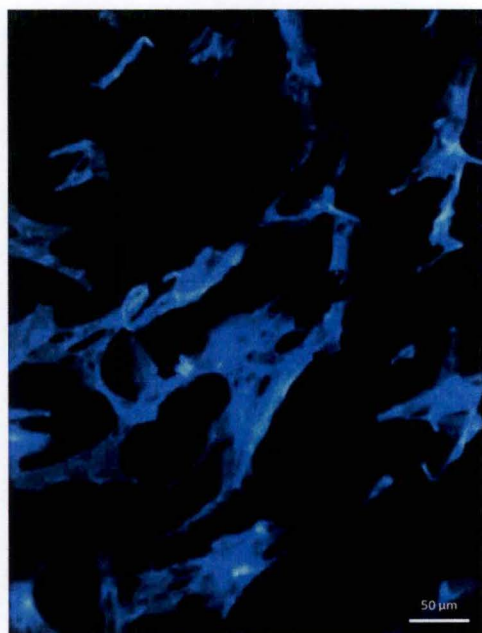
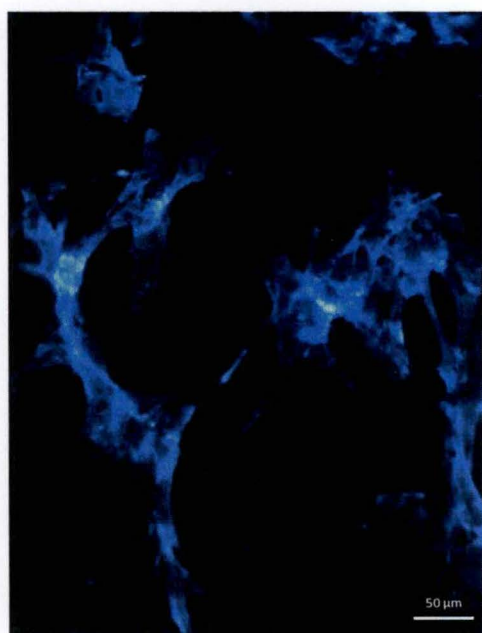
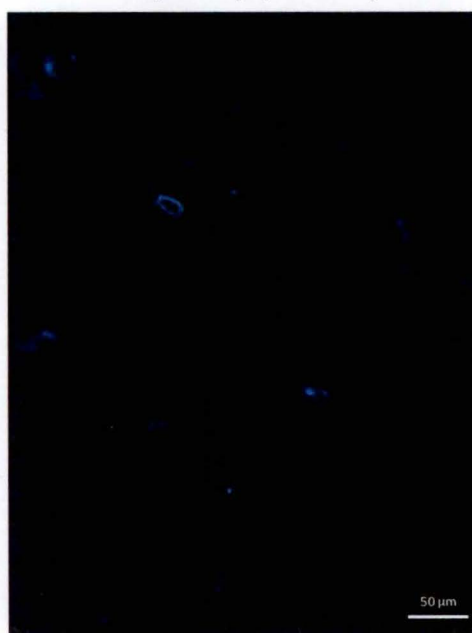
Afin de doser le cholestérol cellulaire, des fibroblastes jeunes (P28 ; 6,1 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P34 ; 90,0 % SA- $\beta$ gal +) ont été déprivés en sérum pendant 16 heures puis traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD. Immédiatement après le traitement, le cholestérol est extrait des fibroblastes puis dosé.

Premièrement, une comparaison du contenu en cholestérol, indépendamment du traitement avec la M $\beta$ CD, a été réalisée entre les fibroblastes jeunes et sénescents. Les résultats montrent que les fibroblastes sénescents ont un contenu en cholestérol diminué de 28 % par rapport aux fibroblastes jeunes (**Figure 34**).





**Figure 34: Dosage du cholestérol cellulaire.** Comparaison du taux de cholestérol entre des fibroblastes jeunes (P28; 6,1 SA-βgal +) et sénescents (P34; 90,0 % SA-βgal +) traités avec de la MβCD. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (jeunes) ou 8.000 cellules/cm<sup>2</sup> (sénescents). Le lendemain, elles sont déprivées en sérum pendant 16 heures puis traitées avec de la MβCD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD. Un dosage protéique est réalisé en parallèle afin de normaliser le taux de cholestérol. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne de triplicats ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel SigmaPlot® en utilisant un test ANOVA 1 (ns = non significatif; \*=0,05 > P > 0,01 ; \*\* = 0,01 > P > 0,001 ; \*\*\* = P < 0,001 ; par rapport au CTL jeunes).

**A****CTL****M $\beta$ CD (7,5 mM)****B****CTL****M $\beta$ CD (7,5 mM)**

**Figure 35: Marquage du cholestérol cellulaire grâce à la filipine chez des fibroblastes jeunes (A) et sénescents (B).** Des fibroblastes jeunes (P28; 7,9 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P38; 94,6 % SA- $\beta$ gal +) sont ensemencés à une densité de 11.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, les cellules sont déprivées en sérum pendant 4 heures puis traitées avec de la M $\beta$ CD (7,5 mM) pendant 1 heure. Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD. Les cellules ont ensuite été marquées avec la filipine, un composé antibiotique qui peut se lier spécifiquement au cholestérol (en bleu). Le marquage est ensuite détecté grâce à une lampe aux UV au microscope confocal.



Ensuite, l'efficacité de la M $\beta$ CD a été étudiée. Un traitement d'une heure avec 7,5 mM de M $\beta$ CD réduit le contenu en cholestérol de 65 % chez les fibroblastes jeunes et de 84 % chez les fibroblastes sénescents.

Ces résultats nous permettent de conclure que le traitement avec de la M $\beta$ CD est donc bien capable de dépléter le cholestérol dans les fibroblastes. Il est à noter cependant qu'il est tout à fait normal que le M $\beta$ CD ne soit pas capable de dépléter l'entièreté du cholestérol puisque cette dernière n'est capable de dépléter que le cholestérol membranaire, alors que le dosage prend en compte l'entièreté du cholestérol cellulaire.

#### *3.4.2.2. Marquage du cholestérol cellulaire grâce à la filipine*

Dans le but de confirmer les résultats obtenus grâce au dosage du cholestérol cellulaire, nous avons réalisé un marquage du cholestérol grâce à la filipine, un antibiotique d'origine bactérienne ayant la capacité de se lier au cholestérol.

Des fibroblastes jeunes (P28 ; 7,9 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P38 ; 94,6 % SA- $\beta$ gal +) ont été déprivés en sérum pendant 4 heures avant d'être traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD. Les cellules sont ensuite immédiatement fixées puis marquées avec la filipine pendant 30 minutes. Le marquage est ensuite visualisé sous excitation en lumière UV.

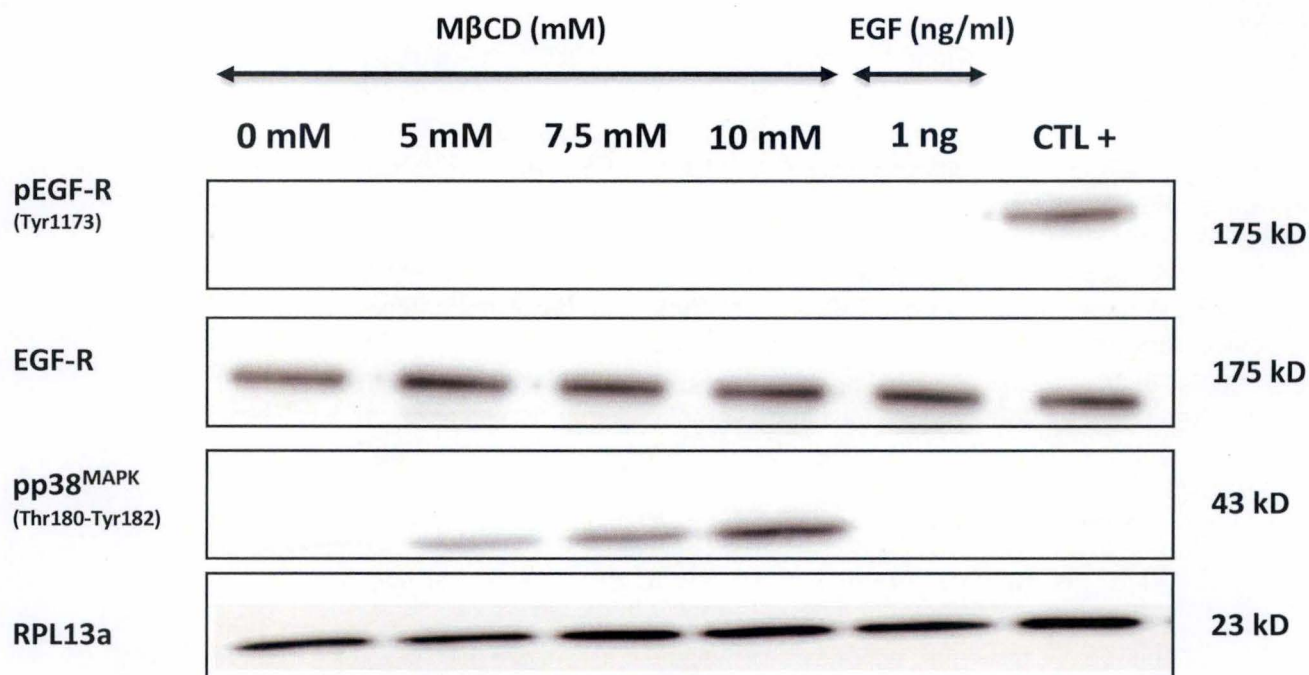
Les résultats montrent que le marquage à la filipine (en bleu) est présent de manière assez homogène dans les fibroblastes non traités avec de la M $\beta$ CD. En revanche, quand les fibroblastes sont traités avec de la M $\beta$ CD, le marquage de la filipine est fortement diminué, voire presque absent dans les fibroblastes jeunes (**Figure 35**).

Les résultats obtenus grâce au marquage du cholestérol avec la filipine nous permettent de confirmer ceux obtenus grâce au dosage du cholestérol, à savoir qu'un traitement avec de la M $\beta$ CD induit bien une diminution du contenu en cholestérol dans des fibroblastes humains de derme.

### **3.4.3. Traitement avec de la M $\beta$ CD**

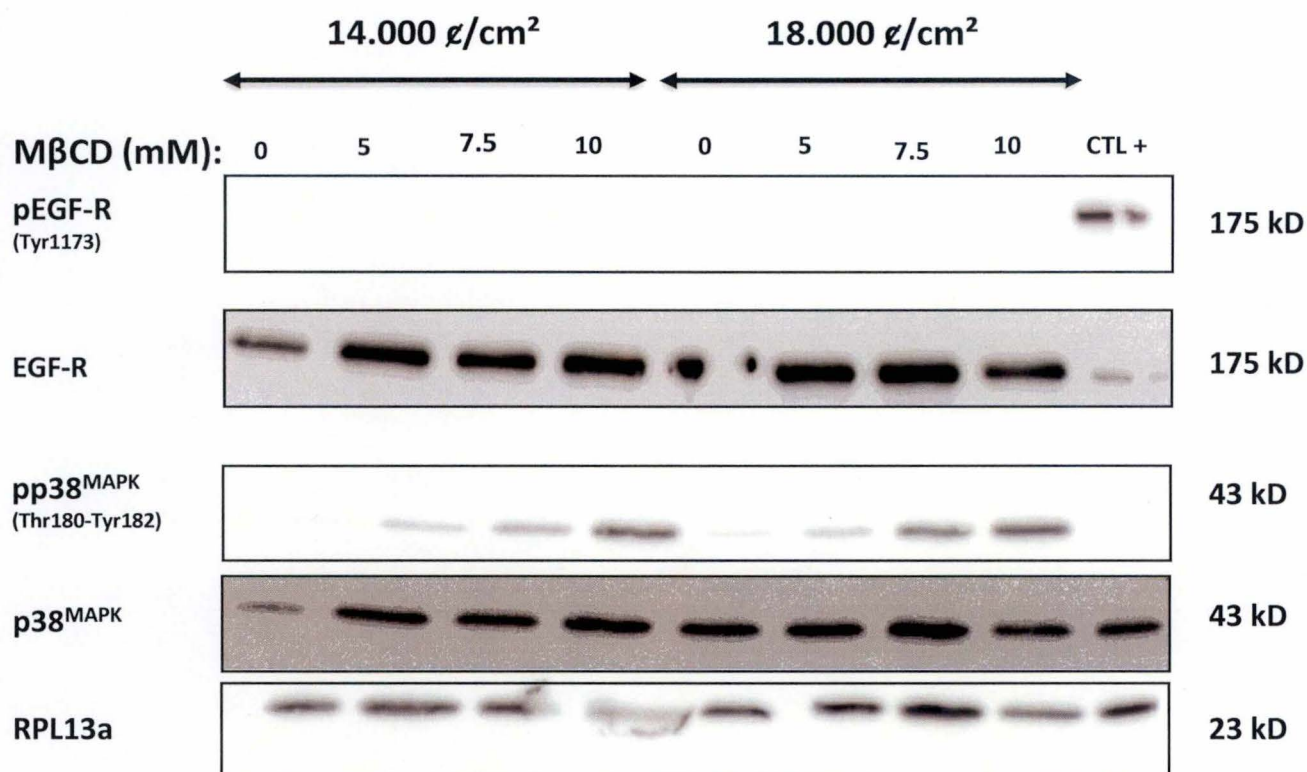
#### **3.4.3.1. Mise au point de la dose de M $\beta$ CD**

Afin d'étudier les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr 180-Tyr182) après une déplétion du cholestérol, des fibroblastes jeunes ont été déprivés en sérum pendant 1 heure puis traités avec de la M $\beta$ CD à différentes concentrations (5, 7,5 ou 10 mM) pendant 1 heure afin de valider la dose idéale de M $\beta$ CD à administrer aux cellules. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD (0 mM). En parallèle, un contrôle positif de stimulation à l'EGF est réalisé (10 ng/ml pendant 20 minutes). Des extractions protéiques sont réalisées et les formes phosphorylées de l'EGF-R



**Figure 36: Analyse de l'abondance protéique des formes phosphorylées et totales l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après un traitement avec de la MβCD chez des fibroblastes jeunes.** Les cellules jeunes (P27, 3,4 % SA-βgal +) sont ensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant 1 heure puis traitées avec différentes concentrations de MβCD (5 mM; 7,5 mM ou 10 mM) pendant 1 heure ou avec de l'EGF (1 ou 10 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD (0 mM). Des extractions protéiques et des analyses en Western blot sont réalisées afin de déterminer le contenu protéique de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R, et de pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182). Le contrôle positif correspond à des fibroblastes jeunes déprivés pendant 16 heures en sérum et stimulés avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes. RPL13a est utilisé comme contrôle de charge.





**Figure 37: Effet de la confluence sur l'abondance protéique des formes phosphorylées et totales de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après un traitement avec de la MβCD chez des fibroblastes jeunes.** Les cellules jeunes sont ensemencées à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> ou de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures puis traitées avec différentes concentrations de MβCD (5 mM, 7,5 mM ou 10 mM) pendant 1 heure. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec la MβCD (0 mM). Des extractions protéiques et des analyses en Western blot sont réalisées afin de déterminer l'abondance protéique de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R, de pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et p38<sup>MAPK</sup>. Le contrôle positif correspond à des fibroblastes jeunes déprivés pendant 16 heures en sérum et stimulés avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes (CTL +). RPL13a est utilisé comme contrôle de charge.

(Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) sont étudiées par Western blot. La protéine RPL13a est utilisée comme contrôle de charge.

Les résultats montrent qu'aucune phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) n'est visible dans les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD, malgré que la phosphorylation soit détectable dans le contrôle positif (**Figure 36**). En revanche, la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est bien visible et semble augmenter graduellement avec la dose de M $\beta$ CD utilisée.

Ces résultats encouragent à tester d'autres conditions de traitement des fibroblastes avec de la M $\beta$ CD, comme par exemple effectuer une déprivation en sérum de 16 heures avant le traitement, et tester d'autres confluences cellulaires.

Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S5.

#### 3.4.3.2. Mise au point de la confluence

Il a été démontré que la signalisation cellulaire suivant une déplétion du cholestérol pouvait être influencée par le niveau de confluence cellulaire, nous avons donc décidé de tester l'effet d'un traitement avec de la M $\beta$ CD sur des fibroblastes repiqués à différentes densités cellulaires.

Dans cette expérience, des fibroblastes jeunes (P27 ; 3,4 % SA- $\beta$ gal +) sontensemencés à une densité de 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> ( $\pm$  80 % de confluence) ou à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (confluence totale). Le lendemain, ils sont déprivés en sérum pendant 16 heures puis traités avec différentes doses de M $\beta$ CD (5, 7,5 ou 10 mM) pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD (0 mM). Un contrôle positif de stimulation avec de l'EGF (10 ng/ml, 20 minutes) est réalisé en parallèle. Des extractions protéiques sont ensuite réalisées et l'abondance des formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) sont analysées en Western blot. La protéine RPL13a est utilisée comme contrôle de charge.

Aucune phosphorylation du récepteur à l'EGF n'est détectée dans les différentes conditions testées après traitement avec la M $\beta$ CD (**Figure 37**), alors que la phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) est clairement visible dans la condition « contrôle positif ». Encore une fois, la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est quant à elle bien visible. Elle semble augmenter graduellement avec la dose de M $\beta$ CD administrée mais ne semble pas être modifiée par le niveau de confluence des fibroblastes.

D'autres formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr992, Tyr1045, Tyr1068 et Ser1046/1047) ont été testées mais n'ont montré aucune activation suite au traitement à la M $\beta$ CD (non montré).

Ces résultats encouragent à tester encore d'autres conditions de traitement des fibroblastes avec de la M $\beta$ CD, comme par exemple le temps de traitement avec de la M $\beta$ CD.

Une quantification de ce Western blot est disponible à la figure supplémentaire S6.



## A Jeunes:

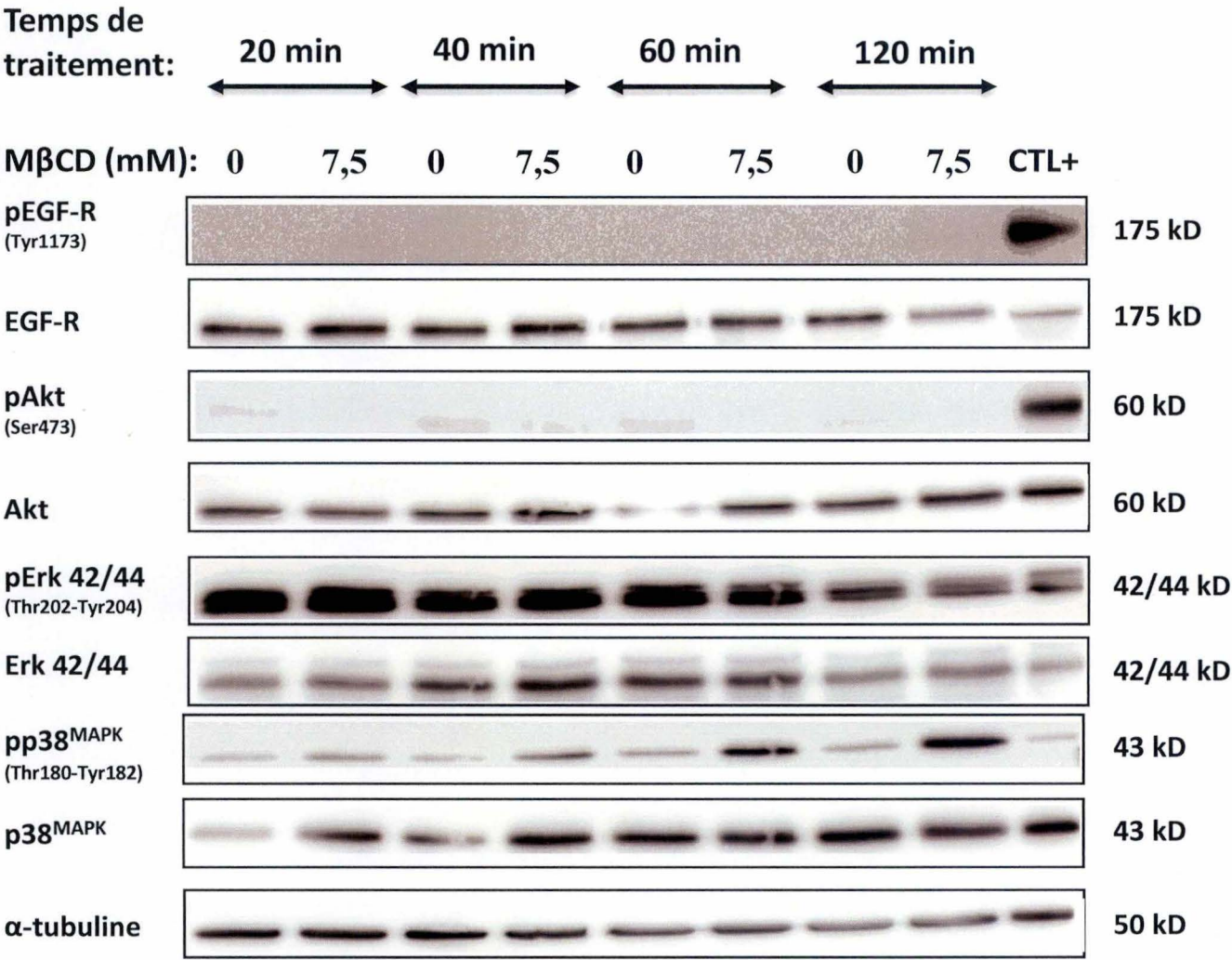
**Temps de traitement:**

20 min      40 min      60 min      120 min

**MβCD (mM):** 0      7,5      0      7,5      0      7,5      0      7,5      CTL+



**B    Sénescentes:**



**Figure 38: Analyse de l'abondance protéique des formes phosphosphorylées et totales de l'EGF-R, de protéines associées à l'activation de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après un traitement avec de la MβCD chez des fibroblastes jeunes (A) et sénescents (B).** Les fibroblastes jeunes (P28 ; 6,0 % SA-βgal +) et sénescents (P34 ; 81,0 % SA-βgal +) sontensemencées à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Ils sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures puis traités avec la MβCD (7,5 mM) pendant 20, 40, 60 ou 120 min. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD (0 mM). Des extractions protéiques et des analyses en Western blot sont réalisées afin de déterminer le contenu protéique de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R, de pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), p38<sup>MAPK</sup>, de pAkt (Ser473), Akt, pErk 1/2 (Thr202-Tyr204) et Erk 1/2 . Le contrôle positif correspond à des fibroblastes jeunes déprivés pendant 16 heures en sérum et stimulés avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes (CTL+). L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.



### 3.4.3.3. Effet du temps de traitement et comparaison entre fibroblastes jeunes et sénescents

Les résultats obtenus précédemment suggèrent qu'il est possible que le temps de traitement de 1 heure de M $\beta$ CD ne soit pas adéquat afin de visualiser la phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173). Nous avons donc réalisé une cinétique suite au traitement de la M $\beta$ CD.

Des fibroblastes jeunes (P28 ; 6,0 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P34 ; 81,0 % SA- $\beta$ gal +) sont ensemencés à une densité de 18,000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, ils sont déprivés en sérum pour une durée de 16 heures puis traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant différents temps (20, 40, 60 ou 120 minutes). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD (0 mM). Un contrôle positif de stimulation avec de l'EGF (10 ng/ml, 20 minutes) est réalisé en parallèle (CTL +). Des extractions protéiques sont ensuite réalisées et les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) ainsi que des protéines sous la dépendance de l'activation de l'EGF-R (Akt, Erk 42/44) sont analysées par Western blot. L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

Les résultats montrent qu'aucune phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) n'est détectée dans les différentes conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD, aussi bien dans les fibroblastes jeunes que sénescents. La phosphorylation d'autres sites de l'EGF-R (Tyr992, Tyr1045, Tyr1068 et Ser1046/1047) a également été recherchée mais sans succès (non montré). En revanche, la phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) est bien détectée dans la condition contrôle positif (**Figure 38 A et B**).

En ce qui concerne la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), on remarque qu'elle est présente dès 20 minutes de traitement avec de la M $\beta$ CD. On observe cependant une différence entre les cellules jeunes et les cellules sénescents. En effet, la phosphorylation semble être forte dès 20 minutes et d'intensité similaire entre les différents temps de traitement dans les fibroblastes jeunes (**Figure 38 A**) alors qu'elle semble augmenter graduellement avec le temps de traitement dans les fibroblastes sénescents (**Figure 38 B**).

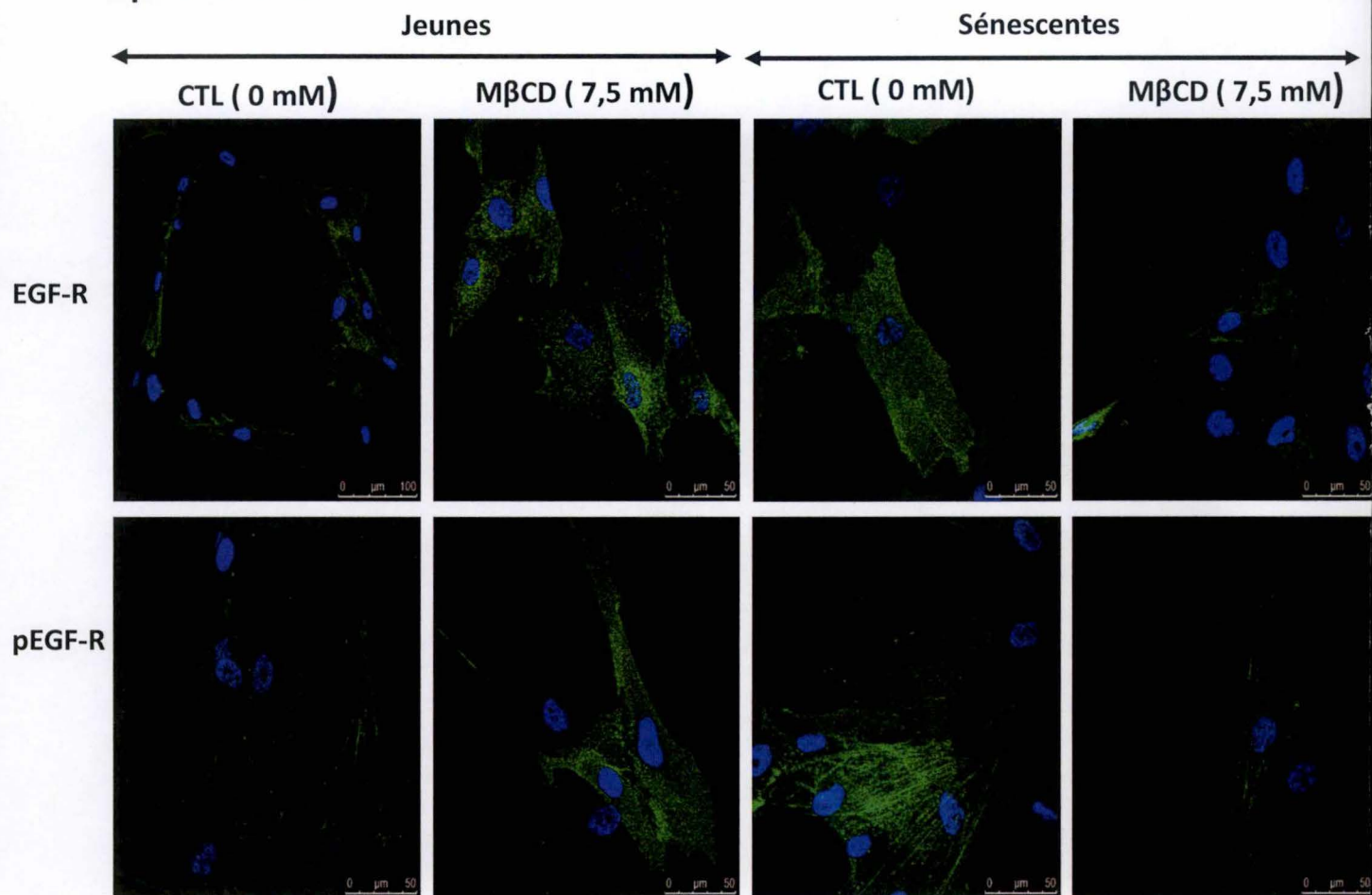
L'expression de la forme totale et phosphorylée de la MAPK 42/44 (Erk 1-2) ne semble pas être modifiée dans les différentes conditions testées. Aucune différence notable ne peut être visualisée entre les fibroblastes jeunes (**Figure 38 A**) et sénescents (**Figure 38 B**).

Par contre, pour la protéine Akt, son profil de phosphorylation (Ser473) semble être beaucoup plus faible dans les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD que dans la condition contrôle positif chez les fibroblastes jeunes (**Figure 38 A**). De plus, la phosphorylation (Ser473) est indétectable dans les fibroblastes sénescents pour les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD alors qu'elle est visible pour la condition contrôle positif (**Figure 38 B**). En ce qui concerne la forme totale de la protéine Akt, elle semble être assez stable entre les différentes conditions, et ce à la fois chez les fibroblastes jeunes et sénescents (**Figure 38 A et B**).

Ces résultats nous permettent de conclure plusieurs choses. Tout d'abord, la phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173, Tyr992, Tyr1045, Tyr1068, Ser1046/1047) est tout à fait indétectable dans les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD, aussi bien chez les fibroblastes jeunes que sénescents, malgré le fait qu'elle soit détectable dans la condition de stimulation avec de l'EGF (10 ng/ml, pendant 20 minutes). Ensuite, il semble que la protéine Erk 42/44 soit quant à elle phosphorylée dans les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD. La phosphorylation

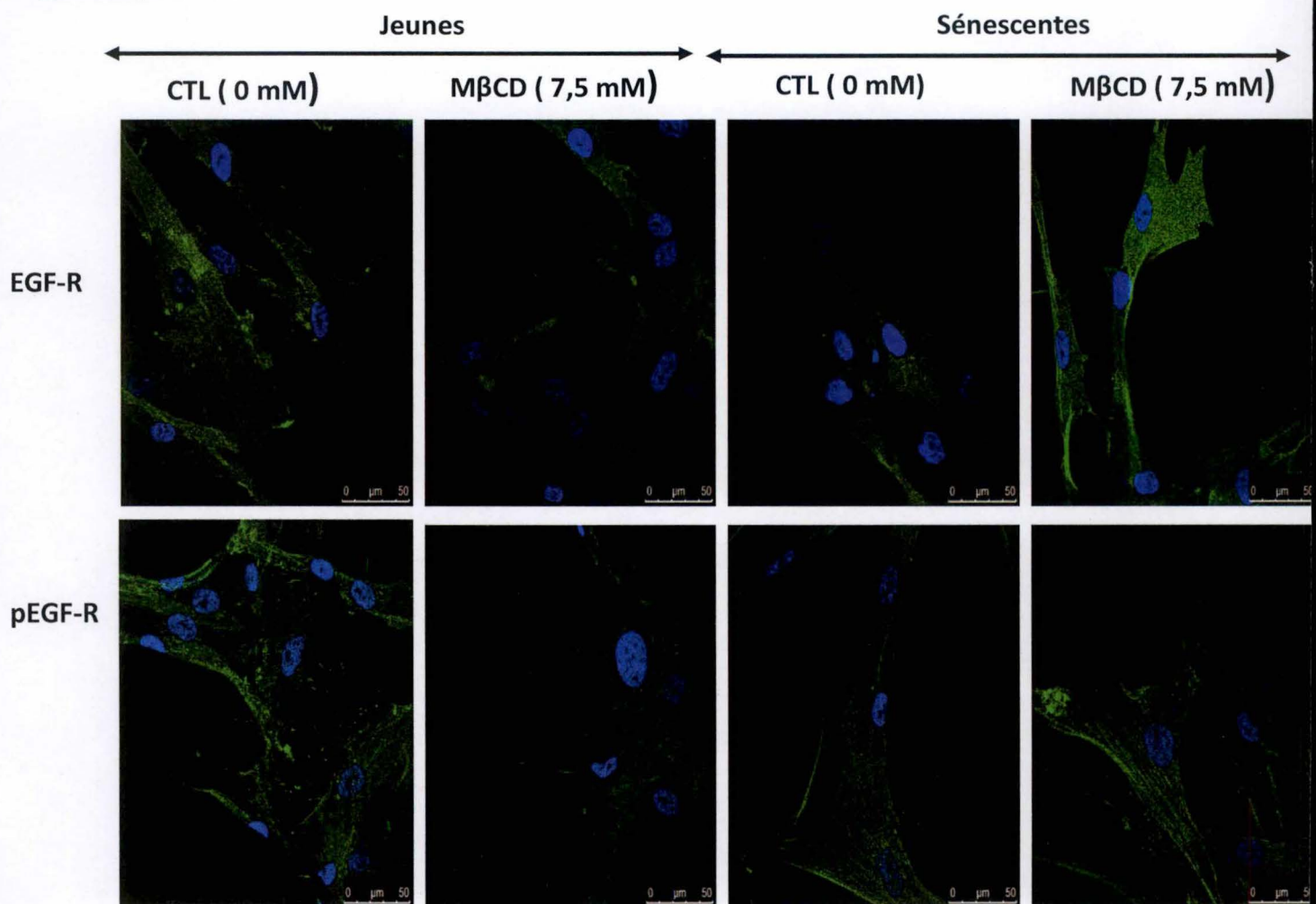
# A

M $\beta$ CD 20 min



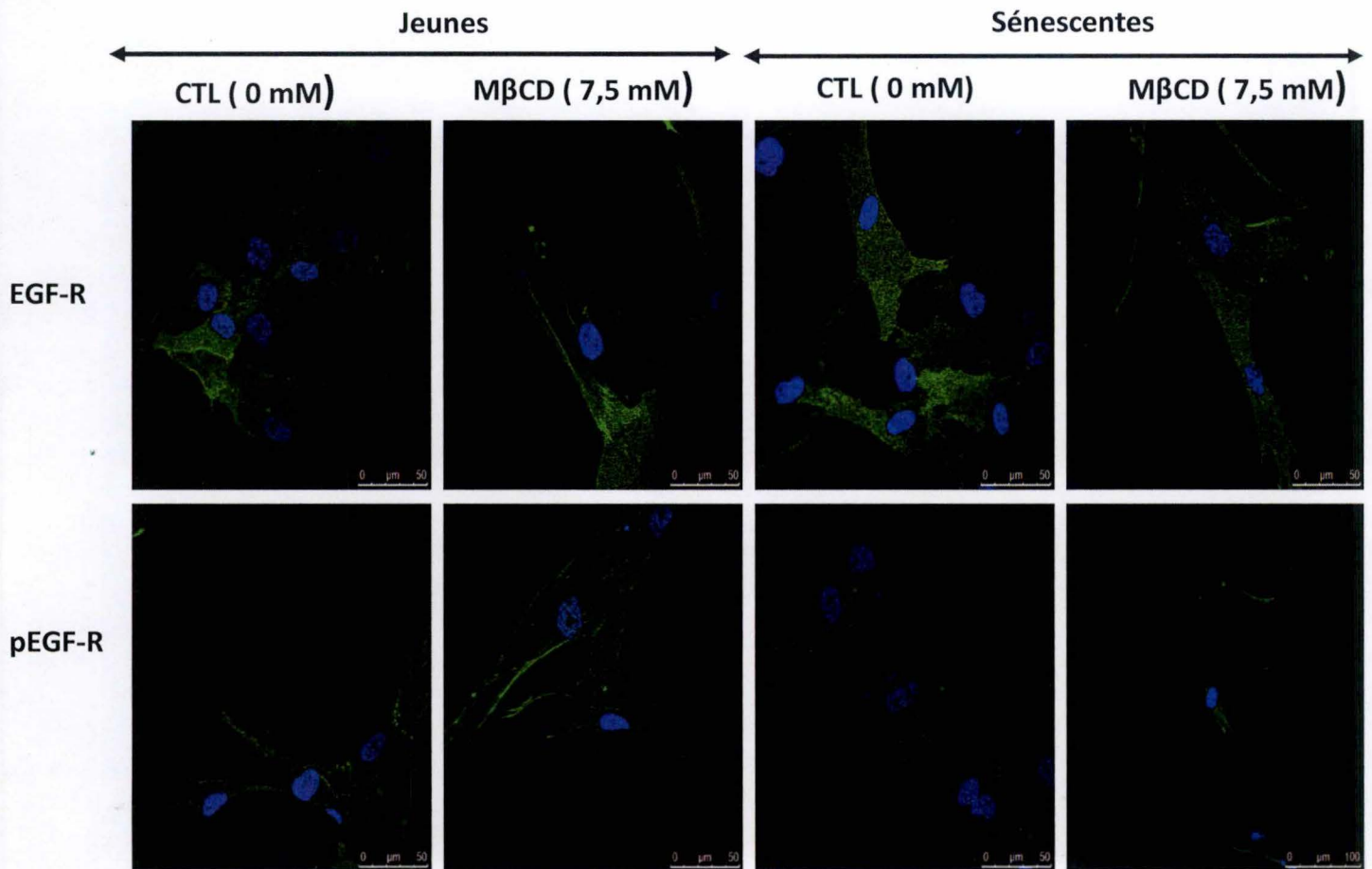
# B

M $\beta$ CD 40 min





# **C** M $\beta$ CD 60 min



**Figure 39: Localisation de l'EGF-R et de pEGF-R (Tyr1173) par immunofluorescence après un traitement avec de la M $\beta$ CD chez des fibroblastes jeunes (P32; 20,6 % SA- $\beta$ gal +) et sénescentes (P38; 88,9 % SA- $\beta$ gal +).** Les cellules sont ensemencées sur des couvres-objets à une densité de 11.000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, elles sont déprivées en sérum pendant 4 heures puis traitées avec de la M $\beta$ CD pendant 20 minutes (A), 40 minutes (B) ou 60 minutes (C). Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec la M $\beta$ CD (0 mM). L'EGF-R et le pEGF-R (Tyr1173) ont été localisés par immunofluorescence en utilisant un anticorps reconnaissant la forme totale de EGF-R (en vert) ou un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée en Tyrosine 1173 de l'EGF-R (en vert). Les noyaux ont été colorés par le TO-PRO3 (en bleu).

de la protéine Akt (Ser473) n'est que très légèrement visible dans les conditions de traitement avec de la M $\beta$ CD chez les fibroblastes jeunes testées et ne permet pas de tirer de conclusion. Ces phosphorylations semblent donc être indépendantes de la voie de l'EGF-R, puisque ce dernier n'est pas phosphorylé. Enfin, on peut observer des différences dans la signalisation entre les fibroblastes jeunes et sénescents, notamment dans le cadre des phosphorylations de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et d'Akt (Ser473).

Des quantifications de ces Western blot sont présentées en figures S7 et S8.

#### **3.4.4. Localisation du récepteur à l'EGF par immunofluorescence**

Afin de vérifier si le récepteur à l'EGF est internalisé ou pas après un traitement avec de la M $\beta$ CD, des fibroblastes jeunes (P32 ; 20,6 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P38 ; 88,9 % SA- $\beta$ gal +) ont été déprivés en sérum pendant 4 heures puis traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 20, 40 ou 60 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD. Immédiatement après le traitement, les cellules sont fixées et incubées avec les anticorps correspondants à la forme totale de l'EGF-R ou à la forme phosphorylée de l'EGF-R (Tyr1173). Les noyaux sont colorés grâce à l'agent intercalant TO-PRO3.

Les résultats montrent que ni la forme totale de l'EGF-R, ni la forme phosphorylée de l'EGF-R (Tyr1173) ne sont internalisés suite à un traitement avec de la M $\beta$ CD, que ce soit après un temps de traitement de 20 (**Figure 39 A**), 40 (**Figure 39 B**), ou 60 minutes (**Figure 39 C**).

Ces résultats confirment donc ceux obtenus par Western blot, à savoir qu'un traitement avec de la M $\beta$ CD n'induit pas d'activation et d'internalisation de l'EGF-R.

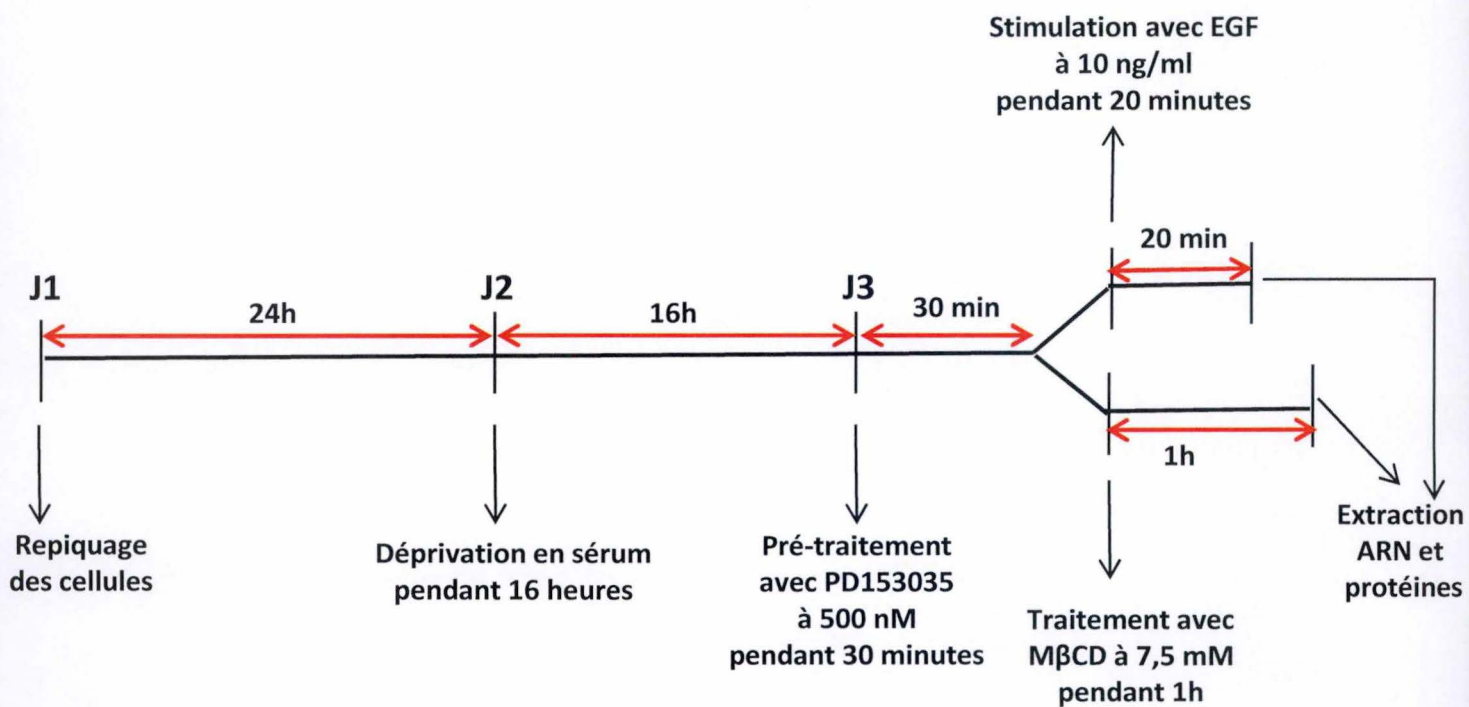
Des expériences de colocalisation entre l'EGF-R et la protéine lysosomale LAMP-1 ont également été réalisées et sont visibles à la figure supplémentaire S9. Aucune colocalisation entre LAMP-1 et l'EGF-R n'a pu être mise en évidence.

#### **3.4.5. Utilisation d'un inhibiteur de l'EGF-R**

Les précédentes expériences de traitement avec de la M $\beta$ CD semblent indiquer que la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est indépendante de l'activation de l'EGF-R. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de réaliser des expériences utilisant un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGF-R, avoir de voir si la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) est présente ou pas après un traitement avec cet inhibiteur.

Pour réaliser cela, nous avons choisi d'utiliser l'inhibiteur PD153035, qui est un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGF-R et qui a déjà été utilisé lors d'études chez des kératinocytes.





**Figure 40: Représentation schématique du protocole de traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035).** Les fibroblastes sont repiqués 24h avant d'être déprivés en sérum pendant 16 heures puis ils sont ensuite pré-incubés avec un inhibiteur du domaine tyrosine kinase de l'EGF-R, PD153035, utilisé à une concentration de 500 nM. Les fibroblastes sont ensuite traités avec de la M $\beta$ CD à 7,5 mM pendant 1 heure ou avec de l'EGF pendant 20 minutes puis les cellules sont lysées afin d'en extraire l'ARN et/ou les protéines.



CTL



PD153035

**Figure 41: Effet d'un traitement avec un inhibiteur du domaine tyrosine kinase de l'EGF-R (PD153035) sur des fibroblastes.** Photos de fibroblastes jeunes (P30) traités ou non avec PD153035 à 500 nM pendant 30 minutes. Les photos sont prises grâce à un microscope à contraste de phase (agrandissement 100 X).

#### 3.4.5.1. Protocole

Un protocole de traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R a été mis au point. Celui-ci débute au jour 1 par le repiquage des fibroblastes à une densité cellulaire précise afin d'éviter les variations dues à la confluence. Le deuxième jour, les cellules sont déprivées en sérum pendant 16 heures puis les fibroblastes sont pré-traités avec un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les fibroblastes sont ensuite stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes ou bien traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. L'ARN et/ou les protéines sont directement extraits après les traitements (**Figure 40**).

#### 3.4.5.2. Morphologie des fibroblastes

Afin de vérifier la morphologie des cellules après un traitement avec un inhibiteur du domaine tyrosine kinase de l'EGF-R, nous avons pris des photos après les traitements et les avons comparées avec les photos des cellules contrôles. Les photos obtenues montrent qu'un traitement avec PD153035 n'induit pas de changement morphologique des fibroblastes par rapport aux cellules contrôles (**Figure 41**).

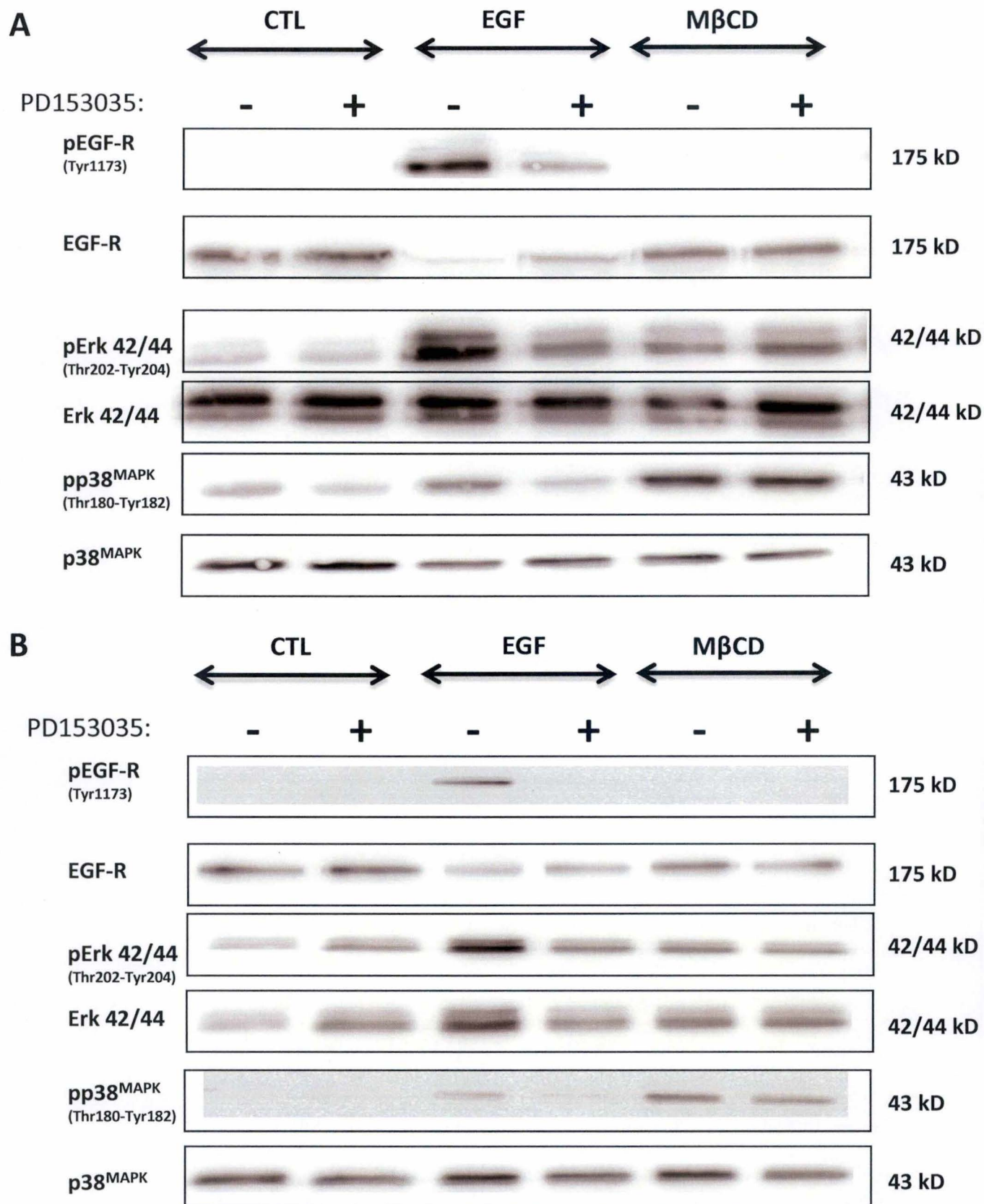
#### 3.4.5.3. Au niveau protéique

Afin d'étudier l'effet d'un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) sur l'activation et donc la phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), des fibroblastes jeunes (P31 ; 15,7 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P40 ; 90,9 % SA- $\beta$ gal +) ont été déprivés en sérum pendant 16 heures puis pré-traités avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être pré-traitées avec PD153035. Les fibroblastes sont ensuite stimulés soit avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes soit traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Des extractions protéiques sont réalisées et les formes phosphorylées et totales de l'EGF-R (Tyr1173), de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) sont étudiées par Western blot. La protéine alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

L'analyse des résultats montre qu'en absence d'un pré-traitement avec l'inhibiteur PD153035, on détecte une phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173), ainsi que p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) (**Figure 42 A et B**) suite à une stimulation à l'EGF. Ceci confirme les résultats précédemment obtenus suite à une stimulation à l'EGF. En revanche, comme cela avait déjà été mis en évidence précédemment, chez les fibroblastes non pré-traités avec l'inhibiteur PD153035 mais incubés avec la M $\beta$ CD, on ne détecte pas une phosphorylation de l'EGF-R (Tyr1173), mais les phosphorylations de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) sont quant à elles bien visibles.

Quand les fibroblastes sont pré-traités avec l'inhibiteur de l'EGF-R PD153035, puis stimulés avec de l'EGF, les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173), p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) sont toujours présentes mais de manière fortement diminuée par rapport à la condition sans pré-traitement avec l'inhibiteur. Par contre, les fibroblastes pré-





**Figure 42:** Analyse de l'abondance protéique de l'EGF-R, de protéines associées à l'activation de l'EGF-R et de p38<sup>MAPK</sup> après un pré-traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) suivi d'un traitement avec de la MβCD ou de l'EGF chez des fibroblastes jeunes (A) et sénescents (B). Les cellules sont ensemencées à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (jeunes, P31, 15,7 % SA-βgal +) ou 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (sénescents, P40, 90,9 % SA-βgal +). Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures afin de minimiser la présence de ligands potentiels de l'EGF-R. Elles sont ensuite pré-traitées ou non avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite traitées avec de la MβCD (7,5 mM) pendant 20, 40, 60 ou 120 min ou avec de l'EGF (10 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD ni avec de l'EGF. Des extractions protéiques et des analyses en Western blot sont réalisées afin de déterminer le contenu protéique de pEGF-R (Tyr1173), EGF-R, de pp38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), p38<sup>MAPK</sup>, pErk 1/2 (Thr202-Tyr204) et Erk 1/2. La forme totale d'Erk 42/44 est utilisée comme contrôle de charge.



traités avec l'inhibiteur puis traités avec la M $\beta$ CD ne semblent pas diminuer les phosphorylations de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204).

L'analyse des résultats suggère tout d'abord que l'utilisation d'un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) permet de diminuer les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173), de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) après une stimulation avec de l'EGF (10 ng/ml, pendant 20 minutes). Ces diminutions de phosphorylations sont à la fois visibles chez les fibroblastes jeunes et sénescents, bien que chez les fibroblastes sénescents, l'utilisation d'un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) semble faire disparaître totalement les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), ce qui confirme leur dépendance à la voie de signalisation en aval de l'EGF-R (**Figure 42 B**). Ensuite, les résultats montrent qu'un pré-traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) avant un traitement avec de la M $\beta$ CD n'induit aucun changement dans la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) et ce à la fois chez les fibroblastes jeunes et sénescents (**Figure 42 A et B**). Cependant, l'intensité des phosphorylations semble différente entre les cellules jeunes et sénescents. En effet, ces phosphorylations semblent moins intenses chez les fibroblastes sénescents (**Figure 42 B**).

Ces résultats nous permettent de conclure que l'utilisation d'un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) diminue bien les phosphorylations de l'EGF-R (Tyr1173), de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) après une stimulation avec de l'EGF. Cependant, cette diminution de phosphorylation n'est pas visible quand les fibroblastes sont traités avec de la M $\beta$ CD après le pré-traitement avec l'inhibiteur, ce qui nous permet de conclure que la phosphorylation des protéines p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et Erk (Thr202-Tyr204) après un traitement avec de la M $\beta$ CD ne semble pas être dépendante de l'activation de l'EGF-R.

#### 3.4.5.4. Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence

Nous avons ensuite voulu savoir quels étaient les effets de ces traitements sur l'expression de certains gènes.

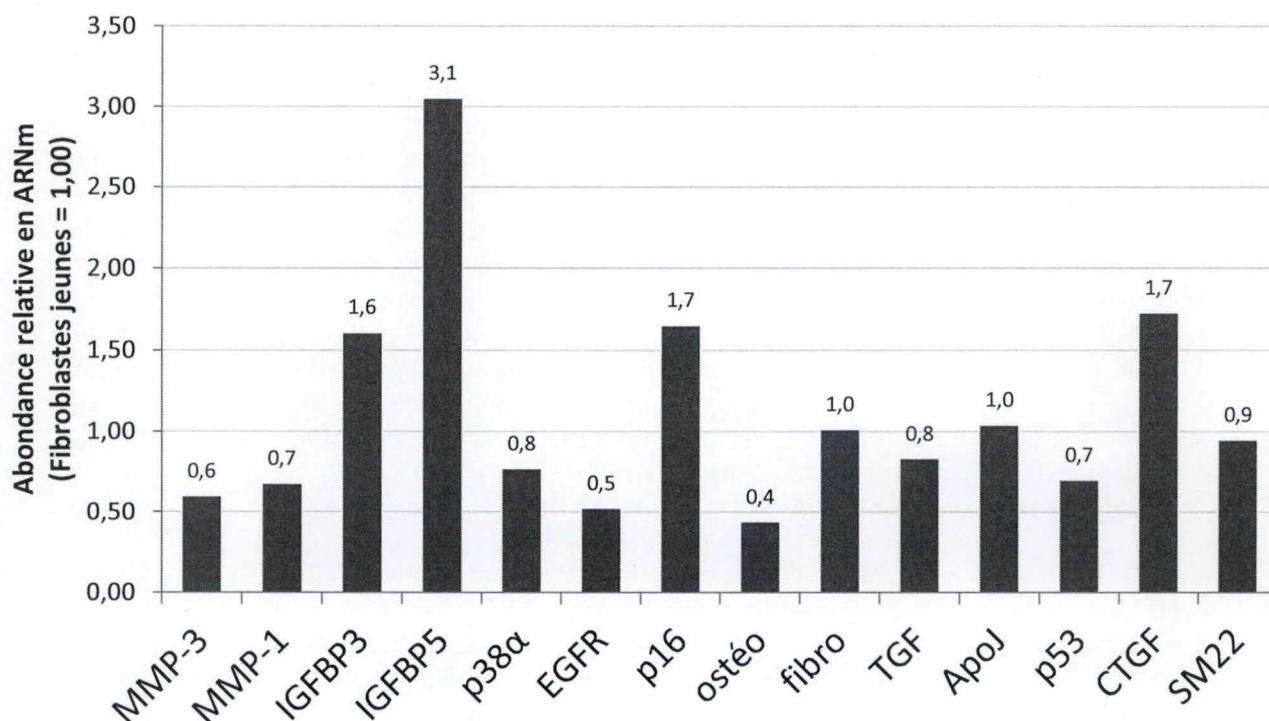
Nous avons choisi d'étudier l'expression d'EGF-R et de p38 $\alpha$  car ils ont également été étudiés en Western blot et une comparaison de leur expression au niveau transcriptionnel par rapport au niveau protéique est intéressante. Les autres gènes (p16<sup>INK-4A</sup>, ostéonectine, fibronectine, SM22, IGFBP3, IGFBP5, Apolipoprotéine J, TGF- $\beta$ 1, MMP-1, MMP-3, p53 et CTGF), sont des gènes qui sont associés à la sénescence puisque leur expression augmente avec la sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2008, Dumont et al., 2000, Kim et al., 2004).

Les voies de signalisation qui permettent l'expression de ces gènes au cours de la sénescence répliquative, sont assez bien caractérisées à l'heure actuelle. Ainsi, l'étude de l'expression de ces gènes dans les conditions de pré-traitement avec un inhibiteur de PD153035, de stimulation avec de l'EGF et de traitement avec de la M $\beta$ CD nous permettra peut-être de nous diriger vers d'autres voies de signalisation intéressantes en fonction des résultats obtenus à partir des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel.

Des fibroblastes jeunes (P31 ; 15,7 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P40 ; 90,9 % SA- $\beta$ gal +) ont été déprivés en sérum pendant 16 heures puis pré-traités avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être pré-traitées avec PD153035. Certains fibroblastes

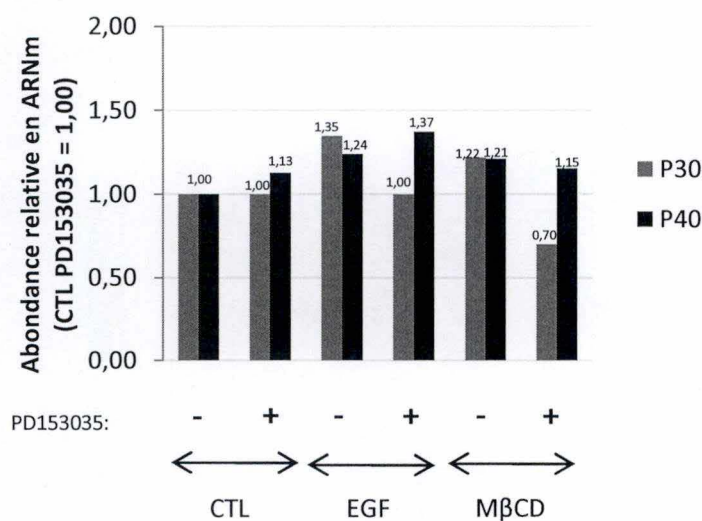


## Expression relative des gènes associés à la sénescence, EGF-R et p38 $\alpha$

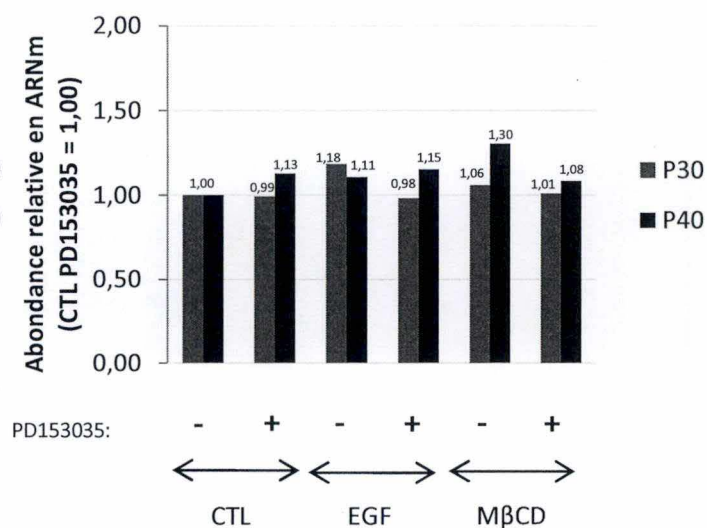


**Figure 43: Expression des gènes associés à la sénescence dans les fibroblastes.** Les cellules sont ensemencées à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (jeunes, P31, 15,7 % SA- $\beta$ gal +) ou 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (sénescents, P40 90,9 % SA- $\beta$ gal, +). Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures. L'ARN est ensuite extrait et rétro-transcrit en ADNc afin de réaliser des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel. GAPDH est utilisé en tant que gène de référence.

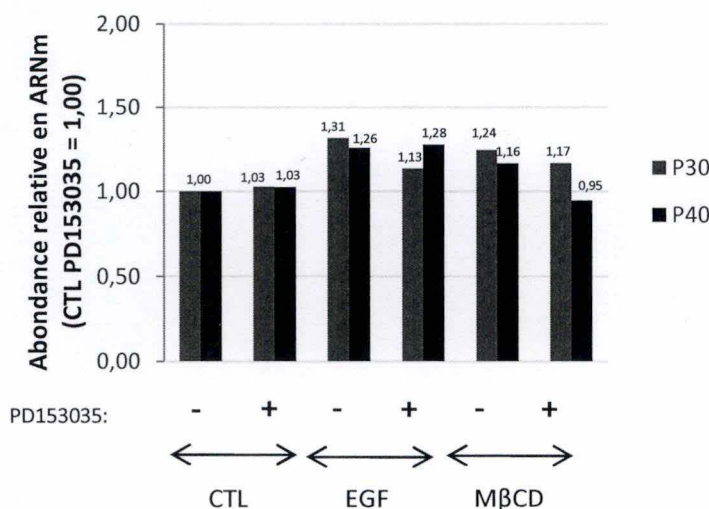
### A Expression relative d'EGF-R



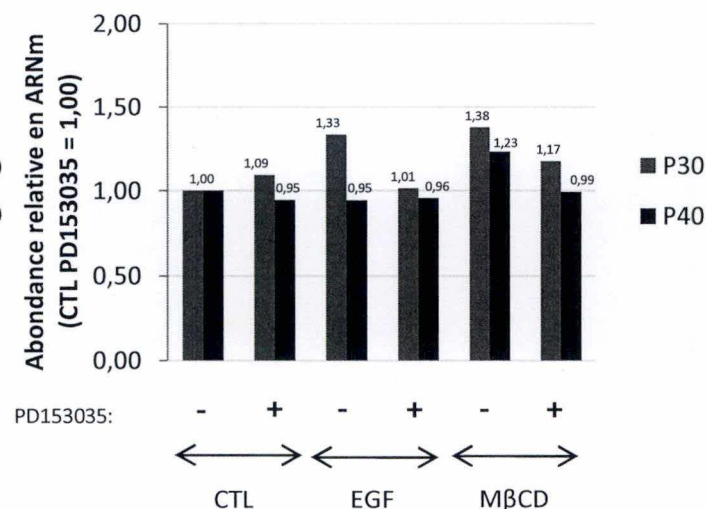
### B Expression relative de p38α



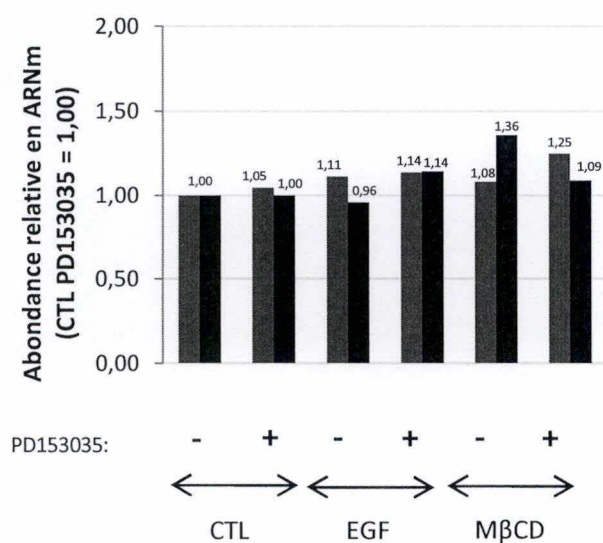
### C Expression relative de IGFBP3



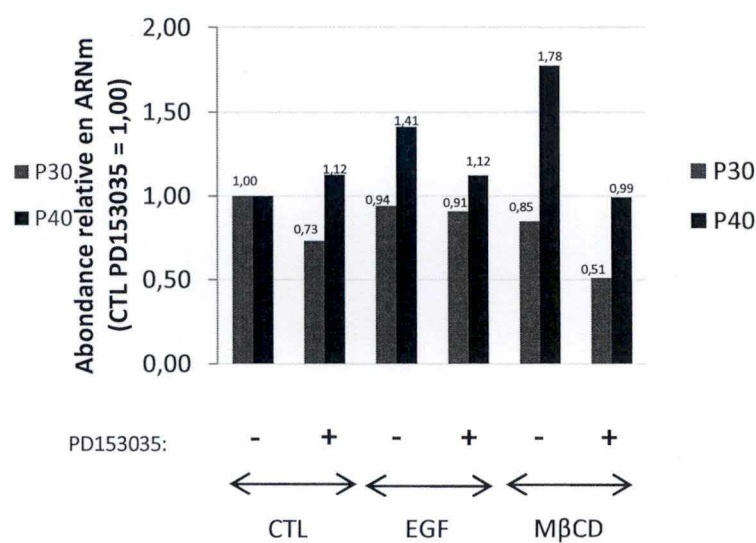
### D Expression relative de IGFBP5



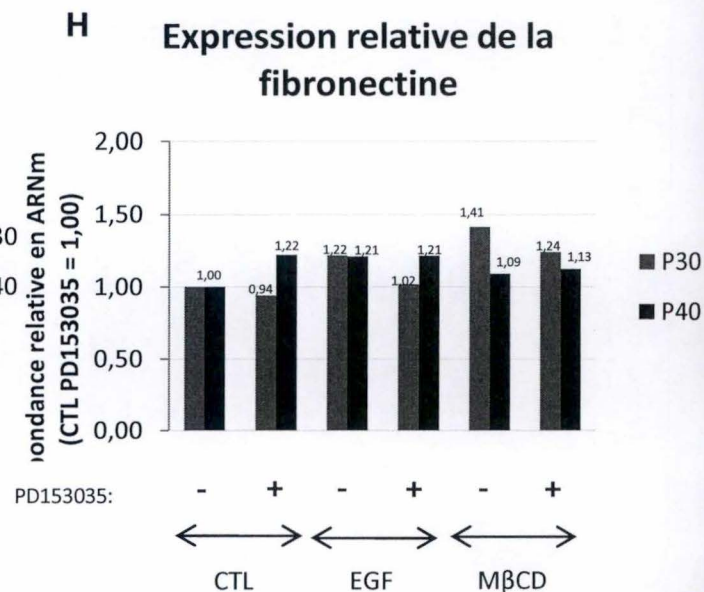
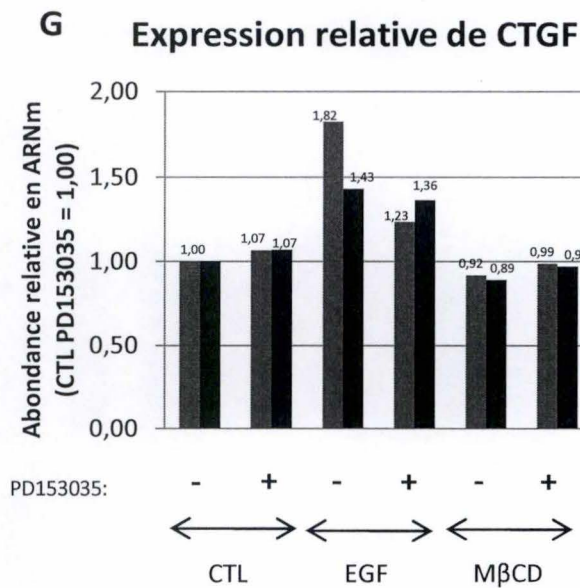
### E Expression relative de MMP-1



### F Expression relative de MMP-3







**Figure 44: Expression des gènes associés à la sénescence, d'EGF-R et de p38α dans les fibroblastes après un traitement avec de la MβCD chez des fibroblastes jeunes et sénescents.** Les cellules sont ensemencées à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup> (jeunes, P31, 15,7 % SA-βgal +) ou 14.000 cellules/cm<sup>2</sup> (sénescents, P40, 90,9 % SA-βgal +). Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures. Elles sont ensuite pré-traitées ou non avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite traitées avec de la MβCD (7,5 mM) pendant 60 min ou avec de l'EGF (10 ng/ml) pendant 20 minutes. Les cellules contrôle sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD ni avec de l'EGF. L'ARN est ensuite extrait et rétro-transcrit en ADNc afin de réaliser des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel. GAPDH est utilisé comme gène de référence.

sont ensuite stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes et d'autres sont traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Après les traitements, l'ARN est extrait et rétro-transcrit en ADNc afin de réaliser des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel.

La première partie de l'analyse se base sur la comparaison des profils d'expression obtenus chez les fibroblastes jeunes et sénescents. Les résultats obtenus montrent que certains gènes associés à la sénescence voient leur expression augmenter d'un passage jeune (P31) à un passage sénescence (P40) (**Figure 43**). Les gènes concernés sont : IGFBP3 (1,6 X), IGFBP5 (3,1 X), p16<sup>INK-4A</sup> (1,7 X) et CTGF (1,7 X). Par contre, certains gènes associés à la sénescence ne voient pas leur expression augmenter, alors que c'était le profil attendu. Ce profil d'expression peut peut-être s'expliquer par le fait que les fibroblastes ont été déprivés en sérum pendant 16 heures avant de réaliser les extractions d'ARN.

Ensuite, nous avons comparé l'expression de ces différents gènes après un pré-traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) suivi d'un traitement avec de l'EGF ou de la M $\beta$ CD. En premier lieu, nous avons analysé l'expression de l'EGF-R (**Figure 44 A**). Comme cela avait déjà été expliqué précédemment, un traitement avec de l'EGF (10 ng/ml, 20 minutes) permet d'induire l'expression de l'EGF-R, principalement chez les fibroblastes jeunes (1,35 X). Chez ceux-ci, le pré-traitement avec PD153035 permet de diminuer l'expression de l'EGF-R (1,00). Par contre, chez les fibroblastes sénescents, l'ajout d'un inhibiteur ne semble pas diminuer l'expression de l'EGF-R (1,37 X) alors que cette diminution était parfaitement visible en Western blot. L'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il faudrait la refaire afin de confirmer les résultats obtenus.

Nous avons ensuite analysé l'expression de p38 $\alpha$  après ces différents traitements (**Figure 44 B**). Les résultats montrent que chez les fibroblastes âgés, un traitement avec de la M $\beta$ CD semble induire l'expression de p38 $\alpha$  (1,30 X). Cette augmentation d'expression n'est cependant pas visible chez les fibroblastes jeunes (1,06 X). Encore une fois, les résultats restent à confirmer par la réalisation de réplicats.

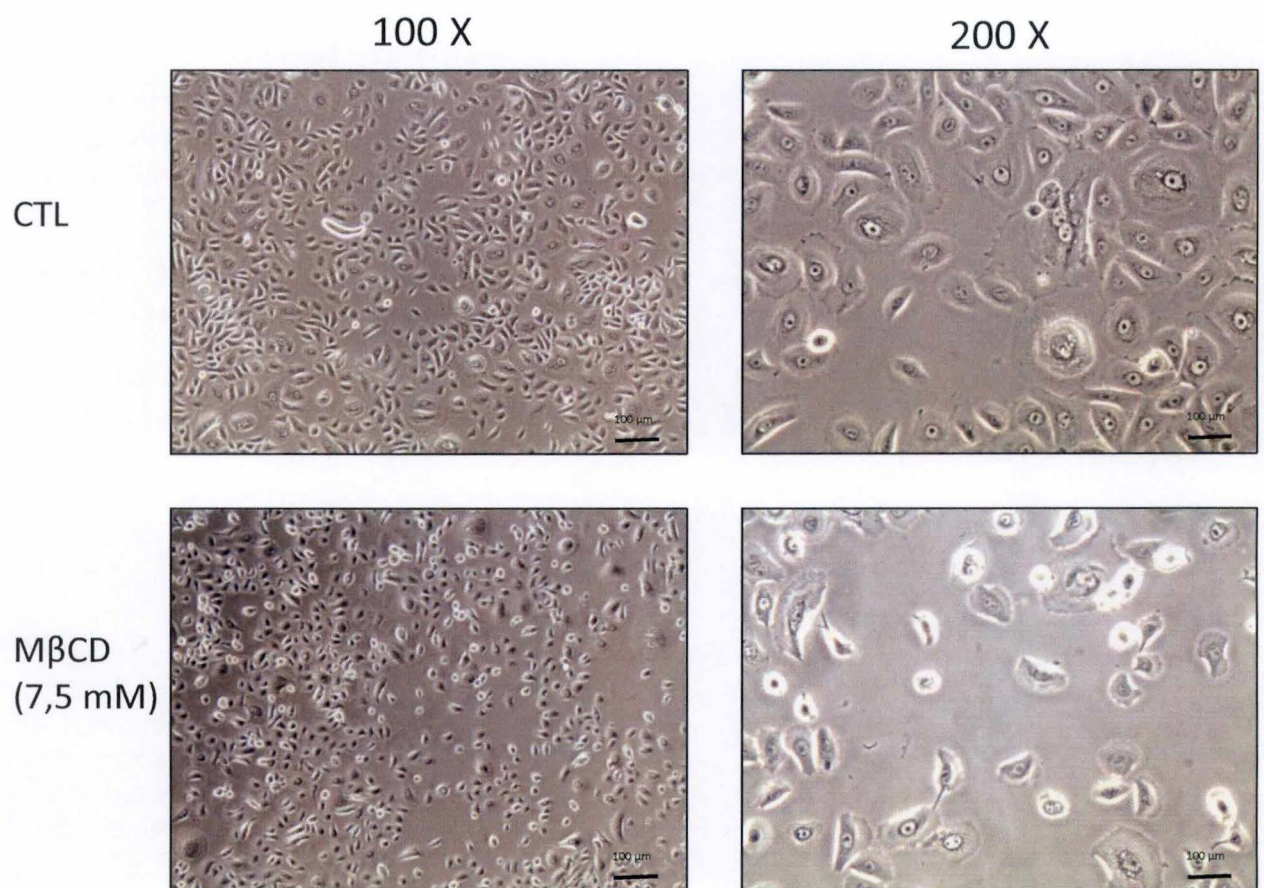
Après cela, nous avons analysé l'expression des gènes associés à la sénescence après ces traitements. Nous avons étudié l'expression de tous les gènes cités plus haut, mais par soucis de simplicité nous ne parlerons que des ceux dont l'expression varie dans l'une ou l'autre condition. En premier lieu, nous avons analysé l'expression d'IGFBP3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3) (**Figure 44 C**). Les résultats montrent que son expression semble augmenter en présence d'EGF chez les fibroblastes jeunes et dans une moindre mesure chez les fibroblastes sénescents. Cette surexpression est diminuée suite au traitement avec l'inhibiteur chez les fibroblastes jeunes mais pas chez les fibroblastes sénescents.

Nous avons ensuite analysé l'expression d'IGFBP5 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5) (**Figure 44 D**). Les résultats montrent que son expression augmente dans les fibroblastes jeunes stimulés avec de l'EGF (1,33 X) ou traités avec la M $\beta$ CD (1,38 X) et que cette surexpression diminue en présence de l'inhibiteur.

Nous avons ensuite étudié l'expression des métalloprotéinases matricielles MMP-1 (**Figure 44 E**) et MMP-3 (**Figure 44 F**). Les résultats montrent que l'expression de MMP-1 semble augmenter dans les fibroblastes âgés traités avec de la M $\beta$ CD (1,36 X) et que l'expression de MMP-3 semble augmenter dans les fibroblastes âgés stimulés avec de l'EGF (1,41 X) ou traités avec de la M $\beta$ CD (1,78 X). Ces différentes surexpressions sont réduites avec l'inhibiteur.

Ensuite, nous avons étudié l'expression du CTGF (**Figure 44 G**). Les résultats montrent qu'une stimulation avec de l'EGF est capable d'induire l'expression du CTGF et ce à la fois





**Figure 45: Effet de la MβCD sur la morphologie des kératinocytes.** Les kératinocytes sont cultivés et sont ensuite traités (ou pas: CTL) avec de la MβCD à 7,5 mM pendant 1 heure. Ils sont ensuite visualisés grâce à un microscope à contraste de phase (agrandissement 100X ou 200X).



chez les fibroblastes jeunes (1,82 X) et chez les fibroblastes sénescents (1,43 X). Comme dans le cas de l'IGFBP-3, cette surexpression est diminuée en présence de l'inhibiteur chez les fibroblastes jeunes mais ne semble pas avoir d'effet chez les fibroblastes sénescents.

Enfin, nous avons étudié le profil d'expression de la fibronectine (**Figure 44 H**). Les résultats montrent que cette dernière voit son expression augmenter en présence de M $\beta$ CD (1,41 X) chez les fibroblastes jeunes et que cette surexpression diminue en présence de l'inhibiteur.

Les résultats de cette expérience nous permettent d'affirmer qu'il semble y avoir des changements dans les niveaux d'expression des gènes étudiés en fonction des traitements administrés. De plus, ces changements semblent être variables entre les fibroblastes jeunes et sénescents. Cependant, il faudrait refaire des répliquats de cette expérience car elle n'a été réalisée qu'une seule fois et émettre des conclusions sur base d'une seule expérience est assez délicat. L'utilisation de l'inhibiteur de l'EGF-R modifie l'expression de certains gènes, ce qui semble démontrer une relation entre l'expression de ceux-ci et la voie de l'EGF-R.

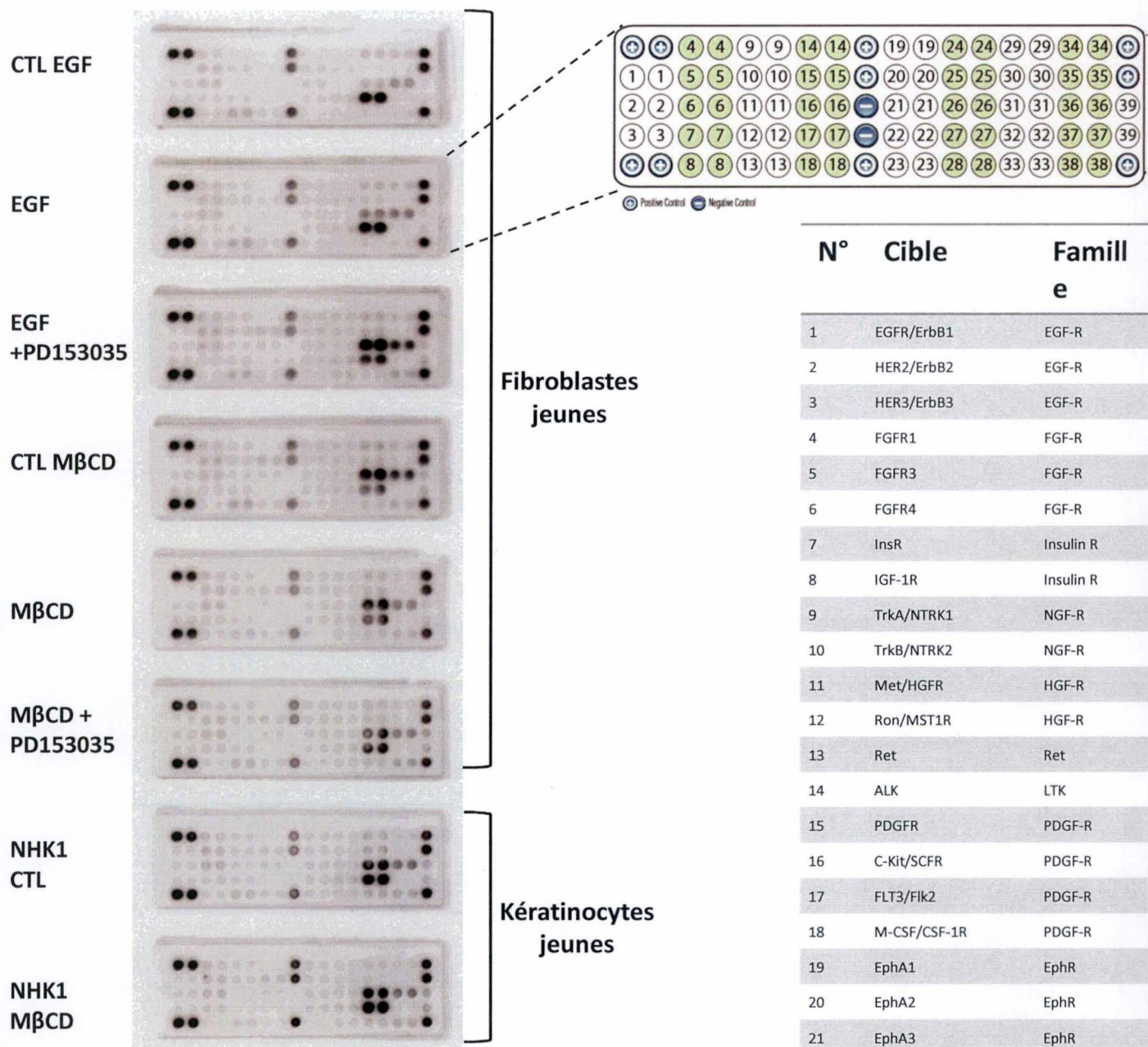
### 3.4.6. PathScan Antibody Array

Les résultats précédents ne permettant pas de déterminer quel(s) récepteur(s) est ou sont activés suite à un traitement avec de la M $\beta$ CD, nous avons décidé de passer en revue plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase dont l'activation pourrait être observée suite à un traitement avec de la M $\beta$ CD. Pour ce faire, nous avons utilisé un kit, développé par la firme Cell Signaling®. Ce kit comprend des membranes de nitrocellulose (16), posées sur des lamelles en verre. Ces membranes possèdent des anticorps immobilisés à leur surface, spécifiques des formes phosphorylées (Pan-tyrosine) d'une série de récepteurs à activité tyrosine kinase (28) et également de protéines de signalisation associées à ces récepteurs (11). L'usage du kit permet donc de réaliser une détection simultanée de l'activité de ces récepteurs à activité tyrosine kinase ainsi que des molécules de signalisation associées. Les membranes sont de plus dotées de contrôles positifs, correspondants à des protéines biotinylées et des contrôles négatifs, correspondants à des IgG non spécifiques. Le lysat cellulaire est ajouté sur une membrane pendant toute une nuit. Le lendemain, un cocktail d'anticorps spécifiques des formes phosphorylées est ajouté. Ces anticorps sont biotinylés, ce qui permet la détection via l'ajout de la streptavidine conjuguée à la Horseradish Peroxydase (HRP). Un agent de détection (LumiGLO®) est ensuite ajouté sur la membrane, ce qui permet de réaliser une détection des anticorps par chimiluminescence. Les « spots » obtenus lors de la révélation peuvent ensuite être éventuellement quantifiés.

Des fibroblastes jeunes (P31 ; 15,7 % SA- $\beta$ gal +) ont été repiqués dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> et sont remis en culture pendant 24 heures. Ils sont ensuite déprivés en sérum pendant 16 heures et après cela, certains sont pré-traités avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) pendant 30 minutes à une concentration de 500 nM, puis stimulés avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes (conditions : EGF ; EGF+PD153035) ou traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure (conditions : M $\beta$ CD ; M $\beta$ CD+ PD153035). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être pré-traitées avec PD153035 et sans être stimulées avec de l'EGF (condition : CTL EGF) ou traitées avec de la M $\beta$ CD (condition : CTL M $\beta$ CD).

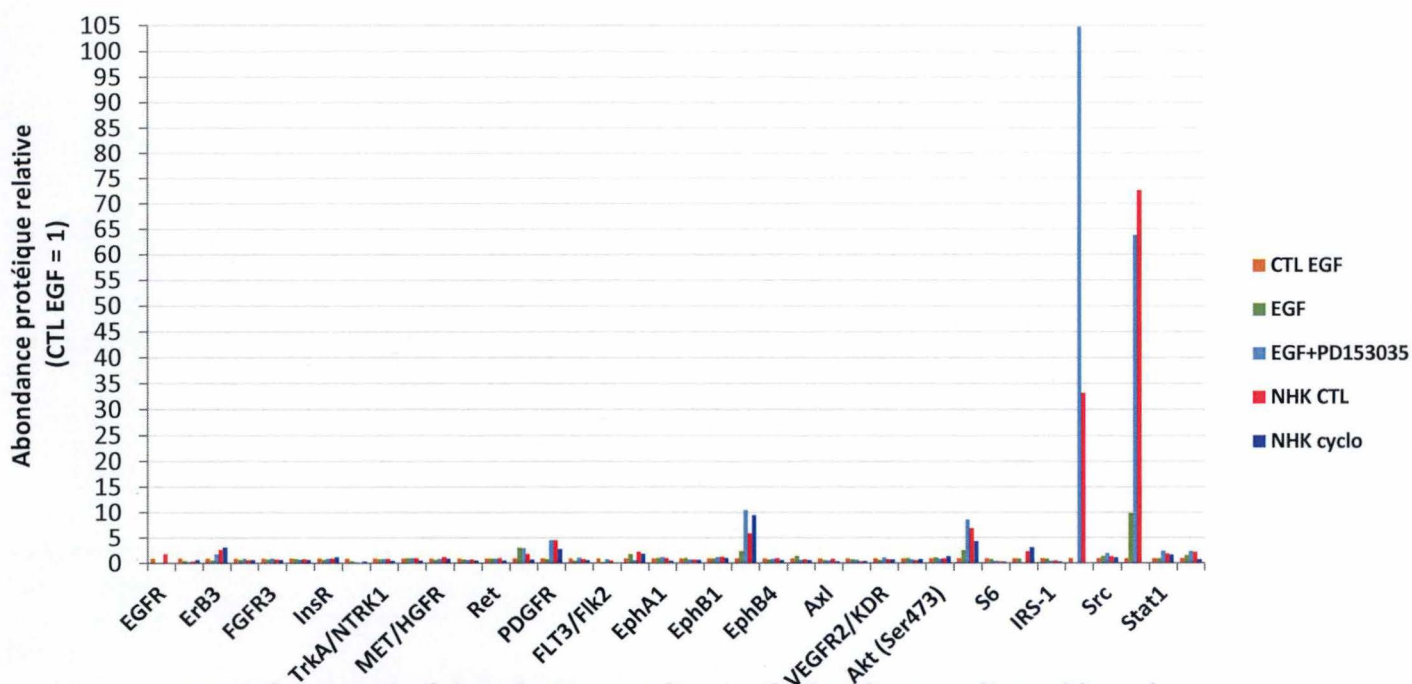
En parallèle, des kératinocytes humains normaux sont également utilisés. Le but est d'étudier leur comportement suite à un traitement avec de la M $\beta$ CD grâce à l'utilisation du kit. Pour rappel, des résultats obtenus en Western blot montraient une activation de l'EGF-R suite à un





**Figure 46: Phosphorylations de différents récepteurs à activité tyrosine kinase et protéines de signalisation après un pré-traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) suivi d'un traitement avec de la MβCD ou de l'EGF chez des fibroblastes jeunes** cellules sontensemencées à une densité de 18.000 cellules/cm<sup>2</sup>. Elles sont ensuite déprivées en sérum pendant une durée de 16 heures puis sont pré-traitées avec un inhibiteur de l'EGF-R (PD153035) à une concentration de 500 nM pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite traitées avec de la MβCD (7,5 mM, 1 heure) ou avec de l'EGF (10 ng/ml, 20 minutes). Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées. La suite du protocole se fait selon les instructions du kit PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Cell Signaling).

Quantification de l'abondance protéique relative des protéines détectées par PathScan après une stimulation avec de l'EGF



Quantification de l'abondance protéique relative des protéines détectées par PathScan après une stimulation avec la MβCD

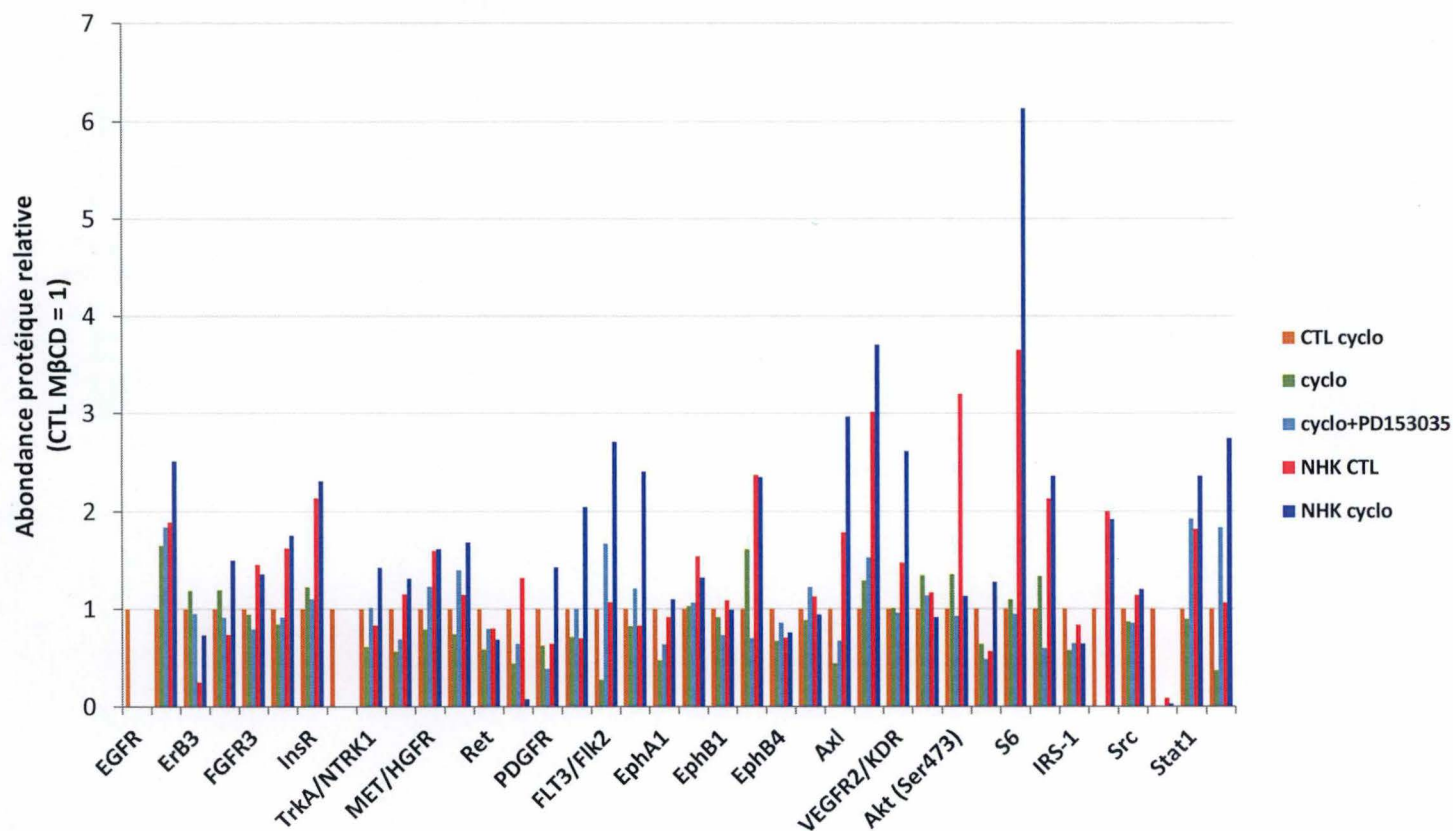
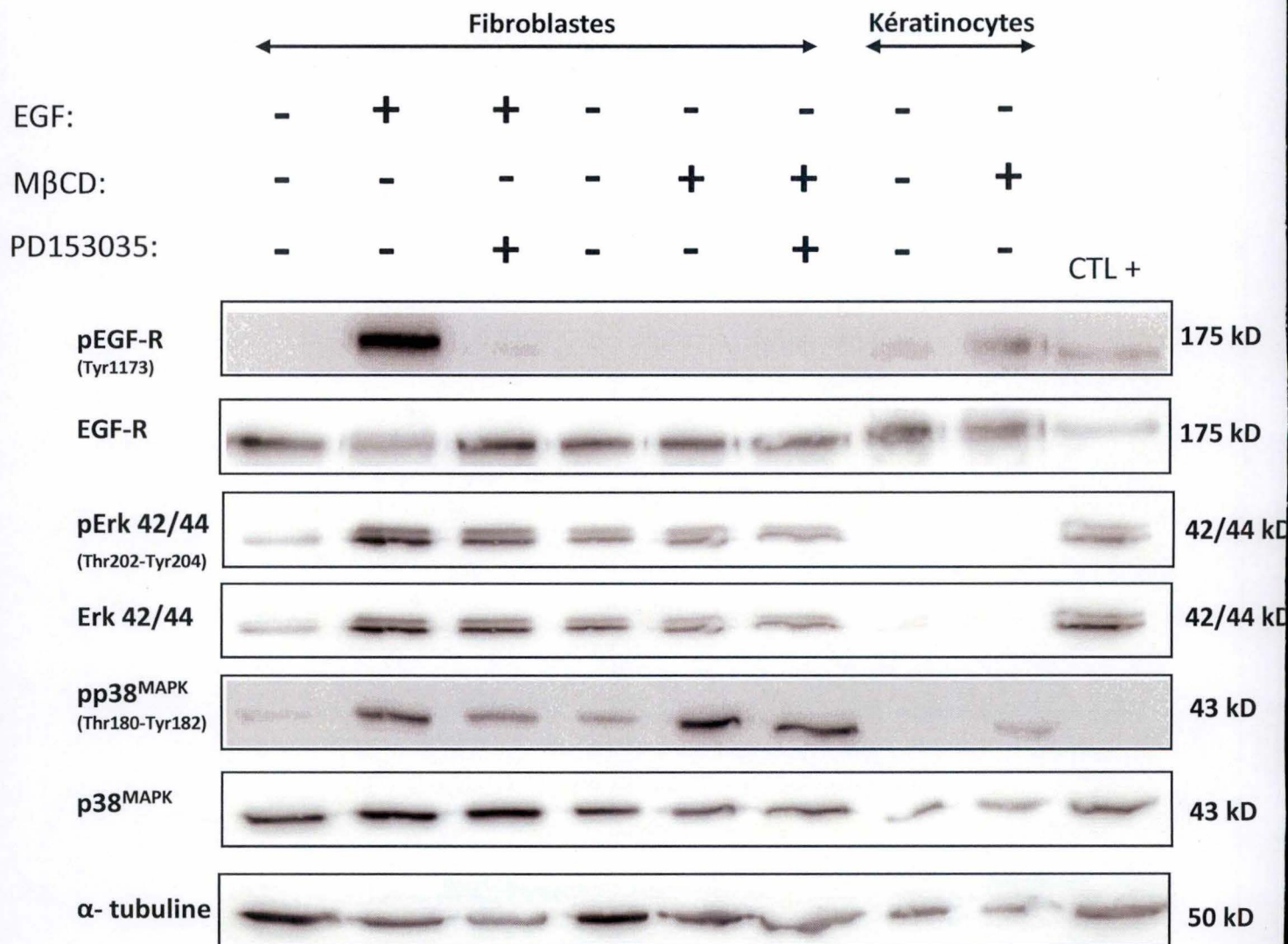


Figure 47: Abondance protéique de récepteurs à activité tyrosine kinase et de molécules de signalisation associées dans des fibroblastes jeunes après un pré-traitement avec un inhibiteur de l'EGF-R suivi d'une stimulation avec de l'EGF ou de la MβCD et dans des kératinocytes jeunes traités avec la MβCD. Quantification réalisée grâce au logiciel QuantityOne® sur base des résultats présentés à la figure 46 (Quantification réalisée par rapport à CTL EGF ou CTL cyclo (cyclo = MβCD)).





**Figure 48:** Analyse de l'abondance protéique des formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173) , de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de pErk 42/44 (Thr202-Tyr204) des échantillons lysés selon le protocole du kit « PathScan Antibody Array RTK signaling ». Des fibroblastes jeunes (P31; 15,7 % SA-βgal +) ont été déprivés en sérum pendant 16 heures et ont ensuite été traités avec la MβCD (7,5 mM, 1 heure) ou avec de l'EGF (10 ng/ml, 20 minutes). Des kératinocytes humains normaux (NHK) ont également été utilisés et ont été traités avec de la MβCD (7,5 mM, 1 heure). Directement après les traitements, les cellules sont lysées selon le protocole fourni par le kit. Un Western blot est réalisé afin de déterminer l'abondance des formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173), de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204). L'alpha-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

traitement avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure (Lambert et al., 2008, Lambert et al., 2010, Lambert et al., 2006). Les kératinocytes sont traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure (condition : NHK M $\beta$ CD). Les kératinocytes contrôles sont soumis aux mêmes conditions sans être traités avec de la M $\beta$ CD (condition : NHK CTL M $\beta$ CD).

Afin de visualiser l'effet de la M $\beta$ CD sur la morphologie des kératinocytes, des photos ont été prises en microscopie à contraste de phase (**Figure 45**). Les kératinocytes contrôles ont des contours cellulaires bien nets et bien réguliers. Cela n'est plus le cas pour les kératinocytes traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. En effet, ces derniers semblent être moins confluents, plus stringents et leurs contours sont beaucoup moins nets par rapport aux kératinocytes contrôles, ils apparaissent plus rétractés.

Les résultats obtenus sont représentés à la **Figure 46**. Les « spots » correspondent chacun à un récepteur à activité tyrosine kinase ou à une protéine de signalisation associée dont les numéros permettent l'identification. Si on regarde l'ensemble des membranes révélées, les principaux spots correspondent à la MAPK 42/44, la protéine ribosomale S6 et la protéine Src. Afin d'avoir une idée plus précise des niveaux relatifs des protéines dans nos échantillons, les « spots » obtenus avec le kit sont quantifiés grâce au logiciel QuantityOne® (**Figure 47**). Les résultats obtenus sont étonnants, si l'expression de certains récepteurs (FGFR1, FGFR2, FGFR3, Ret, PDGFR) et certaines protéines de signalisation (STAT1 et STAT3) semblent être modifiées par ces traitements, les résultats montrent des aberrances à divers endroits. En effet, aucune modification de la phosphorylation de l'EGF-R n'est perceptible alors que les résultats obtenus en Western blot montrent bien une phosphorylation de ce dernier après une stimulation avec de l'EGF. Cette activation n'est pas visible avec le kit. Même résultat pour les kératinocytes : aucune activation de l'EGF-R n'est visible après un traitement avec la M $\beta$ CD, alors que les nombreux articles déjà cités faisaient état de l'activation de l'EGF-R après un tel traitement.

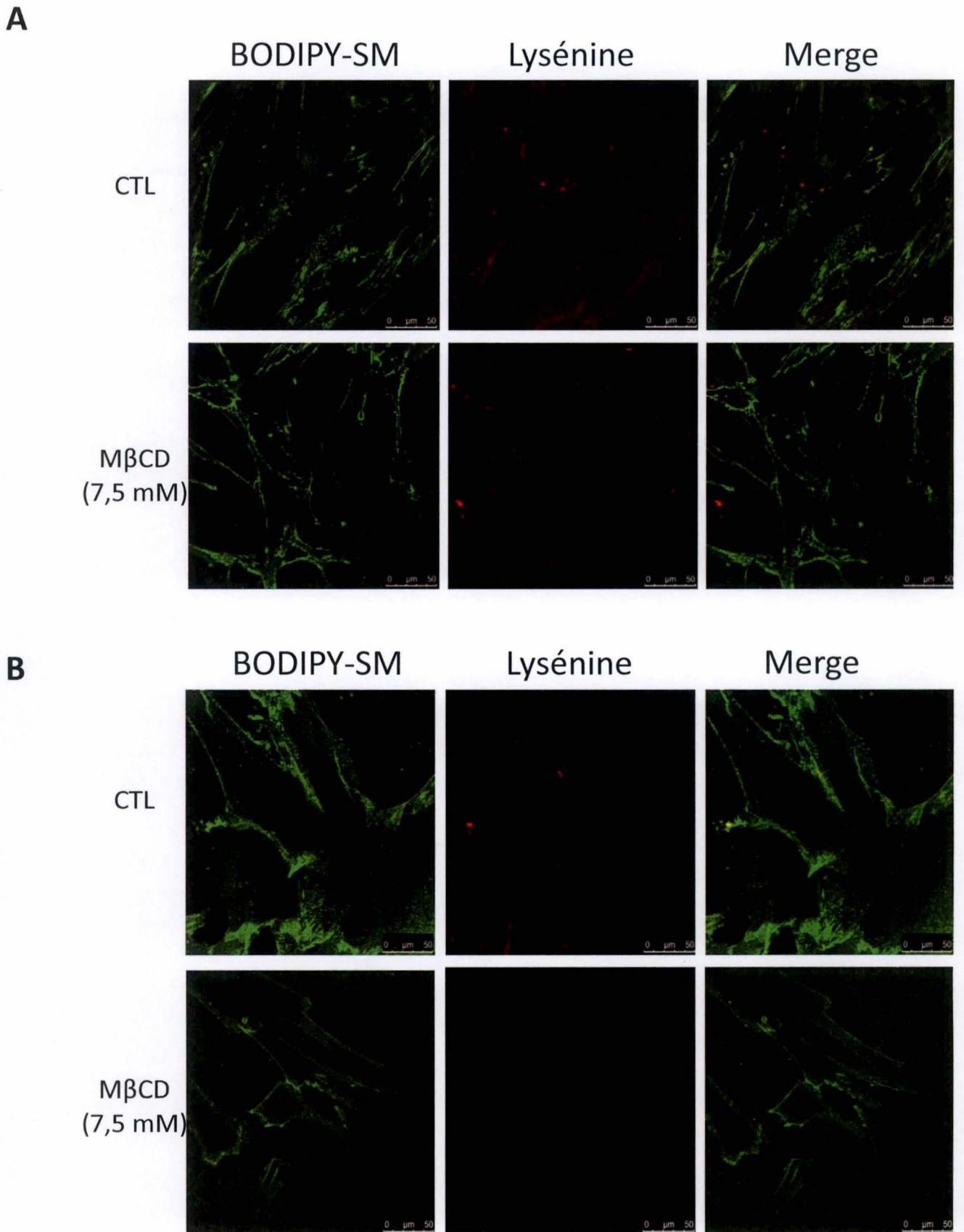
Afin de trouver l'origine du problème, les échantillons qui ont été lysés dans le tampon de lyse du kit sont passés sur un gel de Western blot. Les formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173), de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180/Tyr182) et de Erk 42/44 (Thr202-Tyr204) sont étudiées. Les résultats montrent, qu'en dépit de ce qui a été mis en évidence par le kit, les fibroblastes traités avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml pendant 20 minutes activent bien l'EGF-R (Tyr1173) (**Figure 48**). De plus, cette activation est également visible chez les kératinocytes traités avec la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure.

Ces résultats contradictoires nous permettent de suspecter un problème probable au niveau de la sensibilité du kit, qui semble être trop faible que pour permettre la détection optimale des protéines des nos échantillons. Aucune conclusion ne peut donc être déduite de cette expérience.

### 3.4.7. Marquage de la sphingomyéline

Afin de visualiser les modifications de la répartition des lipides membranaires suite à la déplétion en cholestérol, nous avons décidé de réaliser un marquage de la sphingomyéline. Cette dernière est un lipide entrant dans la composition des membranes plasmiques animales, mais qui est également très présente dans les radeaux lipidiques. Ce critère fait de la





**Figure 49: Marquages de la lysénine et de la sphingomyéline couplée à une sonde BODIPY après un traitement avec la MβCD chez des fibroblastes jeunes (A) et sénescents (B).** Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture Lab-Tek à une densité de 10,000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Elles prolifèrent ainsi pendant 2 jours puis sont déprivées en sérum pendant 16 heures. Elles sont ensuite traitées avec de la MβCD à 7,5 mM pendant 1 heure. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la MβCD (CTL). Les cellules sont ensuite marquées avec la lysénine à une concentration de 1 μM et avec la sonde BODIPY-SM à une concentration de 1 μM également pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules vivantes sont ensuite observées grâce à un microscope confocal.

sphingomyéline un marqueur intéressant dans l'étude des radeaux lipidiques et de leur perturbation.

La détection spécifique de la sphingomyéline dans les fibroblastes peut se faire grâce à une sonde BODIPY (bore-dipyrométhène) couplée à de la sphingomyéline qui, de par sa structure, va pouvoir s'intégrer dans la membrane plasmique. Cette technique est peu invasive car la structure de la sonde est relativement proche de la sphingomyéline naturelle.

De plus, un marquage de la sphingomyéline endogène est réalisé grâce à un marquage à la lysénine, protéine isolée du ver *Eisenia foetidia* ayant une forte affinité pour la sphingomyéline.

Pour réaliser ce marquage, des fibroblastes jeunes (P30 ; 7,0 % SA- $\beta$ gal +) et sénescents (P41 ; 98,7 % SA- $\beta$ gal +) sont ensemencés dans des chambres de culture de type Lab-Tek et incubés pendant deux jours. Ensuite, ils sont déprivés en sérum pendant 16 heures puis traités avec de la M $\beta$ CD à une concentration de 7,5 mM pendant 1 heure. Après le traitement, les fibroblastes sont mis en présence de la sonde BODIPY-SM, utilisée à une concentration de 1  $\mu$ M, et également en présence de la lysénine, à une concentration de 1  $\mu$ M. Ce double marquage permet de visualiser une éventuelle colocalisation entre le marquage réalisé avec la sonde BODIPY-SM et le marquage de la sphingomyéline endogène par la lysénine.

Les résultats montrent que dans les cellules contrôles, aussi bien les jeunes que les sénescents, le marquage de la sphingomyéline grâce à la sonde BODIPY-SM a bien fonctionné puisqu'on peut apercevoir toute une série de points verts correspondants à la sphingomyéline (**Figure 49**). Quand les fibroblastes sont traités avec de la M $\beta$ CD, le marquage de ces points verts correspondants à la sphingomyéline semble diminuer et est localisé essentiellement en membrane plasmique, ce qui signifie que l'utilisation de la M $\beta$ CD perturbe bien les radeaux lipidiques au point de ne plus apercevoir la sphingomyéline.

En ce qui concerne le marquage de la sphingomyéline endogène grâce à la lysénine, il est difficile d'établir un profil de colocalisation étant donné la faible intensité de ce dernier.

Il serait intéressant de répéter ces expériences et de mettre au point les conditions de marquage à la lysénine car cela permet de visualiser les structures membranaires associées aux radeaux lipidiques chez les globules rouges (D'Auria et al., 2013).



## **4. Conclusions, discussion et perspectives**

Tout au long de ce mémoire, nous avons étudié l'effet d'une perturbation des radeaux lipidiques, par l'utilisation de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, sur la signalisation cellulaire dépendante de l'EGF-R, dans des fibroblastes humains de derme. Cette perturbation a été étudiée et comparée chez des fibroblastes jeunes et sénescents.

La première partie de ce mémoire a consisté en l'analyse des biomarqueurs de la sénescence, afin de valider l'état de sénescence des fibroblastes utilisés au cours des diverses expériences. Le suivi d'une culture de fibroblastes sur plusieurs mois, d'un passage précoce (P15) à un passage tardif (P33) nous a permis d'étudier les biomarqueurs de la sénescence au cours de la sénescence répliquative. Nous avons choisi d'étudier trois biomarqueurs de la sénescence : la morphologie des fibroblastes, l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal) et l'expression de p16<sup>INK-4A</sup>. L'analyse des résultats nous permet confirmer que le pourcentage de cellules sénescents augmente avec le nombre de passages cellulaires. En effet, les cellules à un passage tardif sont plus larges que les cellules jeunes, la proportion de cellules positives pour la SA- $\beta$ gal augmente graduellement avec le nombre de passages et enfin l'expression de p16<sup>INK-4A</sup> est plus élevée dans les passages tardifs.

Les critères de validation de la sénescence étant bien établis, nous avons ensuite étudié l'évolution de l'expression de l'EGF-R au cours de la sénescence répliquative. En effet, il semblerait que le niveau d'expression de l'EGF-R diminue lors de la sénescence dans les fibroblastes (Shiraha et al., 2000). Nous avons voulu vérifier cette hypothèse dans les fibroblastes que nous cultivons. L'analyse des résultats permet de confirmer les données récoltées dans la littérature à savoir que le niveau d'expression de l'EGF-R tend à diminuer avec l'âge. Ces résultats ont été confirmés à la fois au niveau protéique par Western blot et au niveau transcriptionnel par des analyses en PCR semi-quantitative en temps réel.

Après cela, nous avons étudié l'effet d'une stimulation avec de l'EGF chez des fibroblastes. Cette étude est basée sur l'analyse des formes phosphorylées de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) par Western blot et l'analyse du niveau d'expression de l'EGF-R et de p38 $\alpha$  après une stimulation par PCR semi-quantitative en temps réel. Après plusieurs mises au point, les résultats montrent que les meilleures conditions pour induire l'activation de l'EGF-R (Tyr1173) et de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182) étaient de stimuler les fibroblastes avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes après une déprivation en sérum de 16 heures. Nous avons également observé une nette différence entre les fibroblastes jeunes et sénescents puisque la phosphorylation est indétectable chez les fibroblastes sénescents. Les résultats obtenus en PCR semi-quantitative en temps réel montrent également des différences entre les fibroblastes jeunes et sénescents puisque ces derniers induisent l'expression de l'EGF-R de manière modérée par rapport aux fibroblastes jeunes.

La suite du mémoire a consisté en l'étude de la perturbation des radeaux lipidiques chez les fibroblastes en utilisant un agent déplétant le cholestérol : la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD). Nous avons d'abord réalisé des mises au point permettant de valider l'effet de la M $\beta$ CD sur les fibroblastes. En effet, si cette molécule avait d'ores et déjà prouvé son efficacité dans la déplétion du cholestérol chez des kératinocytes (Lambert et al., 2006), il a fallu vérifier cet effet sur les fibroblastes. Les expériences de dosage du cholestérol cellulaire et de marquage du cholestérol par la filipine permettent de conclure que la M $\beta$ CD diminue bien le contenu en



cholestérol dans les fibroblastes. De plus, ces expériences réalisées à la fois chez des fibroblastes jeunes et sénescents nous ont permis de montrer des différences dans leur contenu en cholestérol et dans l'efficacité de la M $\beta$ CD : les fibroblastes sénescents semblent contenir moins de cholestérol que les fibroblastes jeunes et la M $\beta$ CD semble diminuer leur contenu en cholestérol de manière légèrement plus importante par rapport aux fibroblastes jeunes.

Nous avons ensuite voulu savoir quel était l'effet d'une déplétion du cholestérol sur la signalisation dépendante de l'EGF-R dans les fibroblastes. Malgré de nombreuses conditions testées (doses, temps d'incubation, confluence cellulaire), aucune ne nous a permis de mettre en évidence l'activation de l'EGF-R (Tyr1173). Cependant, une activation de p38<sup>MAPK</sup> a pu être mise en évidence via la détection de sa forme phosphorylée par Western blot. Cette activation semble être dose-dépendante et également dépendante du temps d'incubation avec la M $\beta$ CD chez les fibroblastes sénescents. Ces résultats laissaient penser que l'activation de p38<sup>MAPK</sup> observée après un traitement avec de la M $\beta$ CD ne semble pas dépendre de l'activation de l'EGF-R.

Une expérience de traitement des cellules avec un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGF-R (PD153035) nous a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, l'utilisation de cet inhibiteur avant un traitement avec de l'EGF diminue l'activation de ce récepteur à l'EGF chez les fibroblastes jeunes et la supprime totalement chez les fibroblastes sénescents. En revanche, l'utilisation de cet inhibiteur avant un traitement avec de la M $\beta$ CD n'induit aucune différence de la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> (Thr180-Tyr182), ce qui confirme donc que cette phosphorylation est indépendante de l'activation de l'EGF-R et doit sans doute passer par une autre voie de signalisation.

Les résultats obtenus au cours de ce mémoire permettent de conclure que les fibroblastes réagissent de manière tout à fait différente à une déplétion du cholestérol par rapport aux kératinocytes puisque ces derniers montraient une activation de l'EGF-R indépendante du ligand suite à un traitement avec de la M $\beta$ CD et cette activation indépendante n'est pas visualisée dans les fibroblastes humains de derme. En revanche, on observe une activation de p38<sup>MAPK</sup> ainsi que de Erk 42/44, comme cela a été observé également dans les kératinocytes (Lambert et al., 2008). Cependant, les phosphorylations observées dans les kératinocytes pour les protéines Erk 42/44 et p38<sup>MAPK</sup> semblent être dépendante de l'activation de l'EGF-R. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGF-R inhibe la phosphorylation de Erk 42/44 observée après un traitement avec de la M $\beta$ CD dans les kératinocytes (Lambert et al., 2006). Le même profil de réponse a été observé en ce qui concerne l'activation de p38<sup>MAPK</sup> (Lambert et al., 2008). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'EGF-R réduit la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> après un traitement avec la M $\beta$ CD, bien que pas totalement. Dans les fibroblastes, l'utilisation de l'inhibiteur de l'EGF-R n'induit aucun changement de phosphorylation ni de p38<sup>MAPK</sup>, ni de Erk 42/44. Les phosphorylations de ces protéines doivent donc dépendre d'une autre voie que celle de l'EGF-R. Certaines études réalisées chez des kératinocytes présentent la déplétion du cholestérol réalisée par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine comme un stress pour la cellule. La réponse à ce stress est l'activation de p38<sup>MAPK</sup> (Jans et al., 2004). La M $\beta$ CD pourrait également induire un stress chez les fibroblastes et pourrait expliquer l'activation de p38<sup>MAPK</sup> observée. Cependant, le mode d'activation de p38<sup>MAPK</sup> dans ces conditions reste un mécanisme encore inconnu à l'heure actuelle. De plus, cette hypothèse n'explique pas la phosphorylation de Erk qu'on observe également après un traitement avec de la M $\beta$ CD.



Une autre comparaison pouvant être faite entre les kératinocytes et les fibroblastes et celle de l'internalisation de l'EGF-R après un traitement avec la M $\beta$ CD. Cette dernière n'était pas visible chez les fibroblastes après un traitement de 20, 40 ou 60 minutes avec de la M $\beta$ CD. Il faut cependant garder en mémoire que le même phénomène est observé chez les kératinocytes. En effet, l'EGF-R n'est pas internalisé directement après un traitement avec de la M $\beta$ CD, mais seulement après 1 à 3 heures de récupération (Lambert et al., 2008). De plus, ce processus semble impliquer la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup>. Dès lors, dans le cadre de perspectives, il serait peut être intéressant de tester l'effet d'un temps de récupération plus long sur l'internalisation de l'EGF-R dans les fibroblastes suite au traitement à la M $\beta$ CD. Enfin, des expériences chez les kératinocytes ont également montré une déphosphorylation progressive de la protéine Akt après un traitement avec la M $\beta$ CD (Calay et al., 2010, Lambert et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les kératinocytes traités avec la M $\beta$ CD se préparent à entrer en apoptose. Ces résultats ne peuvent pas être comparés avec ceux obtenus chez les fibroblastes puisqu'aucun profil de ce type n'a été observé lors d'un traitement avec la M $\beta$ CD. Cependant, l'observation en microscopie à contraste de phase des fibroblastes traités avec la M $\beta$ CD suggère que ces derniers semblent mourir après 2 heures de traitement avec la M $\beta$ CD. Il serait donc intéressant d'explorer différentes voies de mort cellulaire dans le cadre d'un traitement long avec de la M $\beta$ CD chez les fibroblastes.

Les conclusions des expériences menées chez les kératinocytes suggèrent que ces derniers, suite à un traitement avec la M $\beta$ CD, répondent en induisant des voies de différenciation et des voies pro-apoptotiques. Des tests de différenciation chez les fibroblastes pourraient être intéressants afin de voir si le traitement avec la M $\beta$ CD chez les fibroblastes induit le même type de réponse, mais dans ce cas de manière différente que par l'activation de l'EGF-R.

Il faut savoir que la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> observée dans les kératinocytes semble toutefois être en partie indépendante de l'activation de l'EGF-R. Plusieurs pistes sont d'ailleurs exploitées chez les kératinocytes afin de résoudre ce mystère. Afin d'expliquer la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> observée après un traitement avec la M $\beta$ CD chez les fibroblastes, des pistes similaires peuvent être suivies. Tout d'abord, la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> après un traitement avec la M $\beta$ CD chez les kératinocytes pourrait être médiée par les Rho GTPases. En effet, des études de stress osmotiques chez des kératinocytes ont démontré l'implication des Rho GTPases dans l'activation de p38<sup>MAPK</sup> observée après ces stress (Cheng et al., 2002). Les Rho GTPases sont une famille de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans le cycle cellulaire, la morphologie des cellules ou encore la migration cellulaire (Jaffe and Hall, 2005). Dans les fibroblastes, l'activation des Rho GTPases a été associée à l'activation de la phospholipase D2 après un traitement avec de la lovastatine (Cho et al., 2011). L'hypothèse formulée dans cette étude est que la phospholipase D2 est régulateur de la voie Ras/MAPK sensible au cholestérol. Cependant, même si le mécanisme par lequel la phospholipase D2 active Ras est connu, le mécanisme par lequel la déplétion en cholestérol induit l'activation de la phospholipase D2 est encore inconnu. Ces informations constituent donc une piste tout à fait intéressante dans le cadre de notre étude, qu'il serait possible d'exploiter en étudiant les Rho GTPases et la phospholipase D2.

Ensuite, une autre piste exploitable, est celle de la surexpression de PLAUR (Plasminogen Activator Urokinase Receptor) observée après une déplétion en cholestérol chez les kératinocytes (Mathay et al., 2011). PLAUR est responsable de l'activation du plasminogène et est donc impliqué dans des processus de réparation de blessures cellulaires. Un fait intéressant est qu'il est associé au PDGF-R  $\beta$  (Kiyan et al., 2009), un récepteur capable



d'activer toute une série de voies de transduction du signal et notamment la voie des MAPK. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de PLAUR dans les fibroblastes après une déplétion en cholestérol afin de voir si son expression est modifiée ou pas par cette déplétion, ainsi que de se pencher sur l'expression du PDGF-R $\beta$  dans les fibroblastes après une déplétion en cholestérol.

En plus de nous intéresser à la réponse des fibroblastes à une déplétion du cholestérol, nous avons également voulu comparer cette réponse à la fois chez des fibroblastes jeunes et sénescents. En effet, les radeaux lipidiques étant impliqués dans des processus de signalisation cellulaire et sachant que les signalisations sont perturbées avec le vieillissement, il semblait intéressant de corréliser ces deux observations et de les étudier ensemble. Tout d'abord, en ce qui concerne la signalisation cellulaire, les fibroblastes sénescents présentent une réponse à l'EGF plus faible que les fibroblastes jeunes, ce qui confirme des données publiées (Shiraha et al., 2000). Cette perte de réponse est responsable d'une modification des réponses cellulaires induites par l'activation de l'EGF-R et notamment une modification dans les processus de migration et de différenciation. Dans le cadre de la différenciation cellulaire, cette perte de fonctionnalité de l'EGF-R a été associée à la perte d'efficacité de l'HAS 2 (Hyaluronan Synthase 2). Il apparaît en effet que le récepteur à l'EGF interagit avec le récepteur CD44, qui est le récepteur de l'acide hyaluronique (Midgley et al., 2014). Cette voie est impliquée dans des processus de différenciation et se met en place dans le cadre de réparations de blessures. Elle a pour rôle d'enclencher la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes car ces derniers sont capables de fermer la blessure et former une cicatrice de collagène solide (Midgley et al., 2014). Un modèle du fonctionnement de cette voie a été proposé. Chez les fibroblastes jeunes, le TGF- $\beta$ 1 vient se lier sur son récepteur, le récepteur au TGF- $\beta$ . L'activation du récepteur est responsable de l'activation de protéines intracellulaires qui sont les Smad et qui sont des signaux de différenciation pour le fibroblaste. Le récepteur au TGF- $\beta$  activé permet également la sécrétion d'EGF, qui se lie sur son récepteur, l'EGF-R. L'activation de l'EGF-R induit l'expression de HAS2, qui permet ensuite la sécrétion d'acide hyaluronique. Ce dernier se lie au récepteur CD44. Cette liaison entre l'acide hyaluronique et CD44 induit un recrutement de l'EGF-R qui s'associe avec le CD44. Cette association crée une activation des voies de signalisation intracellulaires, notamment l'activation des protéines Erk 42/44 qui induisent la différenciation cellulaire. L'hypothèse est que dans les fibroblastes sénescents, cette voie est altérée et ce pour plusieurs raisons qui sont une diminution de l'expression de l'EGF-R et une suppression de la sécrétion d'EGF dépendante du TGF- $\beta$ 1. La résultante est que l'interaction entre CD44 et EGF-R est moins forte et cela mène à une diminution de la signalisation médiée par les protéines Erk 42/44 et par conséquent à une diminution des voies de différenciation. Ce phénomène pourrait expliquer en partie les altérations observées dans les processus de réparation des blessures avec l'âge (Simpson et al., 2010). Au vu de ces observations réalisées lors d'étude chez des fibroblastes, il serait intéressant de s'attarder un peu plus sur cette voie par exemple en étudiant l'effet d'une perturbation du cholestérol membranaire sur la réponse induite par le récepteur du TGF- $\beta$  (T $\beta$ R) ou par CD44.

De plus, dans le cadre de l'étude de l'effet de M $\beta$ CD, il serait intéressant de réaliser des tests de prolifération car cette dernière est régulée par l'activation de l'EGF-R. Etant donné qu'aucune activation de l'EGF-R n'a été remarquée après un traitement avec la M $\beta$ CD, la prolifération des fibroblastes pourrait en être altérée (Simpson et al., 2010).

D'autre part, l'étude des radeaux lipidiques dans des cellules âgées et tout à fait intéressante car il s'avère que ceux-ci présentent des modifications avec l'âge. En effet, des études ont démontré que le niveau de cholestérol membranaire diminuait avec l'âge. Cette diminution



n'est pas observée pour le contenu en cholestérol cellulaire (Nakamura et al., 2003). Les modifications du contenu en cholestérol cellulaire pourraient expliquer les modifications observées sur la signalisation cellulaire. Les radeaux lipidiques semblent impliqués dans toute une série de pathologies liées au vieillissement. En effet, les modifications observées dans les radeaux lipidiques avec l'âge pourraient être impliquées dans la genèse de la maladie d'Alzheimer par exemple, via la favorisation de la formation du peptide  $\beta$ -amyloïde mais également via la formation d'aggrégats de ces peptides, conduisant à la formation des plaques responsables des effets pathologiques (Ohno-Iwashita et al., 2010). Des modifications des radeaux lipidiques associées à l'âge ont également été associées avec le développement de pathologies telles que l'athérosclérose ou encore le diabète.

Des études ont également suggéré le rôle de la cavéoline-1, une protéine associée aux radeaux lipidiques membranaires, dans l'apparition du phénotype sénescence. Il apparaît que son expression tend à augmenter avec la sénescence cellulaire (Ohno-Iwashita et al., 2010, Zou et al., 2011). De plus, la cavéoline-1 semble interagir avec les RhoA GTPases (Peng et al., 2008). Cette interaction pourrait être intéressante à étudier dans la mesure où les Rho GTPases pourraient être impliquées dans l'activation de  $p38^{MAPK}$  après une déplétion en cholestérol, comme expliqué ci-dessus.

En conclusion générale de ce mémoire, nous pouvons affirmer que les fibroblastes humains de derme ne réagissent pas de façon similaire aux kératinocytes à une déplétion du cholestérol puisqu'ils ne sont pas capables d'activer l'EGF-R dans ces conditions. En revanche, une activation de  $p38^{MAPK}$  est nettement observée et les causes de cette activation n'ont pas été élucidées. De plus, l'étude de la perturbation des radeaux lipidiques a révélé une différence dans la réponse entre les fibroblastes jeunes et les fibroblastes sénescents. Dès lors, d'autres voies de signalisation devraient être investiguées dans le futur comme les voies dépendantes des Rho GTPases, de PDGF-R, de T $\beta$ R et de CD44.

## 5. Bibliographie

- AUBERT, G. & LANSDORP, P. M. 2008. Telomeres and aging. *Physiol Rev*, 88, 557-79.
- BADER, A. N., HOFMAN, E. G., VOORTMAN, J., EN HENEGOUWEN, P. M. & GERRITSEN, H. C. 2009. Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution. *Biophys J*, 97, 2613-22.
- BALBIS, A., PARMAR, A., WANG, Y., BAQUIRAN, G. & POSNER, B. I. 2007. Compartmentalization of signaling-competent epidermal growth factor receptors in endosomes. *Endocrinology*, 148, 2944-54.
- BARBUTI, A., GRAVANTE, B., RIOLFO, M., MILANESI, R., TERRAGNI, B. & DIFRANCESCO, D. 2004. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res*, 94, 1325-31.
- BEERMAN, I. & ROSSI, D. J. 2014. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. *Exp Cell Res*.
- BOYETTE, L. B. & TUAN, R. S. 2014. Adult Stem Cells and Diseases of Aging. *J Clin Med*, 3, 88-134.
- BRUNET, A. & BERGER, S. L. 2014. Epigenetics of aging and aging-related disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S17-20.
- CALAY, D., VIND-KEZUNOVIC, D., FRANKART, A., LAMBERT, S., POUMAY, Y. & GNIADECKI, R. 2010. Inhibition of Akt signaling by exclusion from lipid rafts in normal and transformed epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 130, 1136-45.
- CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CARPENTER, G. & COHEN, S. 1978. Human epidermal growth factor: binding of the polypeptide to human fibroblasts and stimulation of cell proliferation. *Natl Cancer Inst Monogr*, 149-56.
- CASTRO, B. M., SILVA, L. C., FEDOROV, A., DE ALMEIDA, R. F. & PRIETO, M. 2009. Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes. *J Biol Chem*, 284, 22978-87.
- CASTRO, B. M., TORRENO-PINA, J. A., VAN ZANTEN, T. S. & GRACIA-PARAJO, M. F. 2013. Biochemical and imaging methods to study receptor membrane organization and association with lipid rafts. *Methods Cell Biol*, 117, 105-22.
- CHENG, H., KARTENBECK, J., KABSCH, K., MAO, X., MARQUES, M. & ALONSO, A. 2002. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol*, 192, 234-43.
- CHO, K. J., HILL, M. M., CHIGURUPATI, S., DU, G., PARTON, R. G. & HANCOCK, J. F. 2011. Therapeutic levels of the hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor lovastatin activate ras signaling via phospholipase D2. *Mol Cell Biol*, 31, 1110-20.
- COPPE, J. P., DESPREZ, P. Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118.
- D'AURIA, L., FENAUX, M., ALEKSANDROWICZ, P., VAN DER SMISSEN, P., CHANTRAIN, C., VERMYLEN, C., VIKKULA, M., COURTOY, P. J. & TYTECA, D. 2013. Micrometric segregation of fluorescent membrane lipids: relevance for endogenous lipids and biogenesis in erythrocytes. *J Lipid Res*, 54, 1066-76.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., BORLON, C., PASCAL, T., ROYER, V., ELIAERS, F., NINANE, N., CARRARD, G., FRIGUET, B., DE LONGUEVILLE, F., BOFFE, S., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 118, 743-58.



- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., PASCAL, T., BOILAN, E., BASTIN, C., BAUWENS, E. & TOUSSAINT, O. 2008. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 44, 1817-32.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- DUMONT, P., BURTON, M., CHEN, Q. M., GONOS, E. S., FRIPPIAT, C., MAZARATI, J. B., ELIAERS, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, 28, 361-73.
- DUMONT, P., ROYER, V., PASCAL, T., DIERICK, J. F., CHAINIAUX, F., FRIPPIAT, C., DE MAGALHAES, J. P., ELIAERS, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2001. Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, 502, 109-12.
- EL-SAYED, A. & HARASHIMA, H. 2013. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther*, 21, 1118-30.
- FERON, O. & BALLIGAND, J. L. 2006. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc Res*, 69, 788-97.
- FRANCESCHI, C. & CAMPISI, J. 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S4-9.
- FREUND, A., ORJALO, A. V., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*, 16, 238-46.
- FRIPPIAT, C., CHEN, Q. M., ZDANOV, S., MAGALHAES, J. P., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2001. Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, 276, 2531-7.
- FULOP, T., LE PAGE, A., GARNEAU, H., AZIMI, N., BAEHL, S., DUPUIS, G., PAWELEC, G. & LARBI, A. 2012. Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection. *Longev Healthspan*, 1, 6.
- GARY, R. K. & KINDELL, S. M. 2005. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem*, 343, 329-34.
- GIMPL, G. & GEHRIG-BURGER, K. 2007. Cholesterol reporter molecules. *Biosci Rep*, 27, 335-58.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARDER, T., SCHEIFFELE, P., VERKADE, P. & SIMONS, K. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*, 141, 929-42.
- HARDOUIN, S., BOURGEOIS, F., BESSE, S., MACHIDA, C. A., SWYNGHEDAUW, B. & MOALIC, J. M. 1993. Decreased accumulation of beta 1-adrenergic receptor, G alpha s and total myosin heavy chain messenger RNAs in the left ventricle of senescent rat heart. *Mech Ageing Dev*, 71, 169-88.
- HAYFLICK, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37, 614-36.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HELDIN, C. H. 2013. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, 11, 97.
- HIPP, M. S., PARK, S. H. & HARTL, F. U. 2014. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*, 24, 506-14.
- IVY, S. P., WICK, J. Y. & KAUFMAN, B. M. 2009. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 569-79.



- IWAMOTO, M., MORITA, I., FUKUDA, M., MUROTA, S., ANDO, S. & OHNO-IWASHITA, Y. 1997. A biotinylated perfringolysin O derivative: a new probe for detection of cell surface cholesterol. *Biochim Biophys Acta*, 1327, 222-30.
- JACKSON, A. P., FLETT, A., SMYTHE, C., HUFTON, L., WETTEY, F. R. & SMYTHE, E. 2003. Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor micro2 kinase. *J Cell Biol*, 163, 231-6.
- JAFFE, A. B. & HALL, A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 247-69.
- JANS, R., ATANASOVA, G., JADOT, M. & POUMAY, Y. 2004. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol*, 123, 564-73.
- JARES-ERIJMAN, E. A. & JOVIN, T. M. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21, 1387-95.
- JU, H., ZOU, R., VENEMA, V. J. & VENEMA, R. C. 1997. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem*, 272, 18522-5.
- KANG, M. K., GUO, W. & PARK, N. H. 1998. Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ*, 9, 85-95.
- KIM, K. H., PARK, G. T., LIM, Y. B., RUE, S. W., JUNG, J. C., SONN, J. K., BAE, Y. S., PARK, J. W. & LEE, Y. S. 2004. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 819-25.
- KIM, Y. M., BYUN, H. O., JEE, B. A., CHO, H., SEO, Y. H., KIM, Y. S., PARK, M. H., CHUNG, H. Y., WOO, H. G. & YOON, G. 2013. Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell*, 12, 622-34.
- KIYAN, J., SMITH, G., HALLER, H. & DUMLER, I. 2009. Urokinase-receptor-mediated phenotypic changes in vascular smooth muscle cells require the involvement of membrane rafts. *Biochem J*, 423, 343-51.
- KLOTZSCH, E. & SCHUTZ, G. J. 2013. A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20120033.
- KNIGHT, Z. A., LIN, H. & SHOKAT, K. M. 2010. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer*, 10, 130-7.
- KURZCHALIA, T. V. & PARTON, R. G. 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 424-31.
- KUSUMI, A., KOYAMA-HONDA, I. & SUZUKI, K. 2004. Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*, 5, 213-30.
- LAJOIE, P. & NABI, I. R. 2010. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 282, 135-63.
- LAMBERT, S., AMEELS, H., GNIADOCKI, R., HERIN, M. & POUMAY, Y. 2008. Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *J Cell Physiol*, 217, 834-45.
- LAMBERT, S., FRANKART, A. & POUMAY, Y. 2010. p38 MAPK-regulated EGFR internalization takes place in keratinocyte monolayer during stress conditions. *Arch Dermatol Res*, 302, 229-33.
- LAMBERT, S., VIND-KEZUNOVIC, D., KARVINEN, S. & GNIADOCKI, R. 2006. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol*, 126, 954-62.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D. & HWANG, E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.
- LEE, H. C., PANG, C. Y., HSU, H. S. & WEI, Y. H. 1994. Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta*, 1226, 37-43.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-34.



- LI, S., COUET, J. & LISANTI, M. P. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 271, 29182-90.
- LI, S., OKAMOTO, T., CHUN, M., SARGIACOMO, M., CASANOVA, J. E., HANSEN, S. H., NISHIMOTO, I. & LISANTI, M. P. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem*, 270, 15693-701.
- LI, Y. B., ZHONG, Z. F., CHEN, M. W., BAO, J. L., WU, G. S., ZHANG, Q. W., LEE, S. M., HOI, P. M. & WANG, Y. T. 2013. Bisdemethoxycurcumin Increases Sirt1 to Antagonize t-BHP-Induced Premature Senescence in WI38 Fibroblast Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 851714.
- LIN, W., KAO, H. W., ROBINSON, D., KUNG, H. J., WU, C. W. & CHEN, H. C. 2000. Tyrosine kinases and gastric cancer. *Oncogene*, 19, 5680-9.
- LINGWOOD, D., RIES, J., SCHWILLE, P. & SIMONS, K. 2008. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10005-10.
- LISANTI, M. P., TANG, Z., SCHERER, P. E., KUBLER, E., KOLESKE, A. J. & SARGIACOMO, M. 1995. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol*, 12, 121-4.
- LOPEZ-OTIN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M. & KROEMER, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-217.
- MARTINI, M., DE SANTIS, M. C., BRACCINI, L., GULLUNI, F. & HIRSCH, E. 2014. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*, 46, 372-83.
- MASLOV, A. Y., BARONE, T. A., PLUNKETT, R. J. & PRUITT, S. C. 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci*, 24, 1726-33.
- MATHAY, C., GILTAIRE, S., MINNER, F., BERA, E., HERIN, M. & POUMAY, Y. 2008. Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*, 128, 717-27.
- MATHAY, C., PIERRE, M., PITTELKOW, M. R., DEPIEREUX, E., NIKKELS, A. F., COLIGE, A. & POUMAY, Y. 2011. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol*, 131, 46-58.
- MATHAY, C. & POUMAY, Y. 2010. Lipid rafts and the oxidative stress hypothesis. *J Invest Dermatol*, 130, 1457-9.
- MEDRANO, E. E., YANG, F., BOISSY, R., FAROOQUI, J., SHAH, V., MATSUMOTO, K., NORDLUND, J. J. & PARK, H. Y. 1994. Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol Biol Cell*, 5, 497-509.
- MIDGLEY, A. C., BOWEN, T., PHILLIPS, A. O. & STEADMAN, R. 2014. MicroRNA-7 inhibition rescues age-associated loss of epidermal growth factor receptor and hyaluronan-dependent differentiation in fibroblasts. *Aging Cell*, 13, 235-44.
- MINEO, C., JAMES, G. L., SMART, E. J. & ANDERSON, R. G. 1996. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem*, 271, 11930-5.
- MINNER, F., HERPHELIN, F. & POUMAY, Y. 2010. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol*, 585, 71-82.
- MUNRO, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115, 377-88.
- NAKAMURA, M., KONDO, H., SHIMADA, Y., WAHEED, A. A. & OHNO-IWASHITA, Y. 2003. Cellular aging-dependent decrease in cholesterol in membrane microdomains of human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 290, 381-90.
- ODA, K., MATSUOKA, Y., FUNAHASHI, A. & KITANO, H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 1, 2005 0010.
- OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HAYASHI, M. & INOMATA, M. 2010. Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int*, 10 Suppl 1, S41-52.



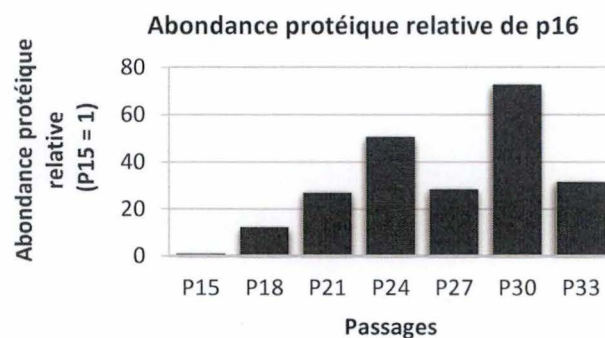
- OWONIKOKO, T. K. & KHURI, F. R. 2013. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*.
- PALADE, G. E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1, 188-211.
- PARK, S. C., PARK, J. S., PARK, W. Y., CHO, K. A., AHN, J. S. & JANG, I. S. 2002. Down-regulation of receptor-mediated endocytosis is responsible for senescence-associated hyporesponsiveness. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 45-9.
- PARK, W. Y., PARK, J. S., CHO, K. A., KIM, D. I., KO, Y. G., SEO, J. S. & PARK, S. C. 2000. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem*, 275, 20847-52.
- PARTON, R. G. & DEL POZO, M. A. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 98-112.
- PARTON, R. G. & SIMONS, K. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 185-94.
- PENG, F., ZHANG, B., WU, D., INGRAM, A. J., GAO, B. & KREPINSKY, J. C. 2008. TGFbeta-induced RhoA activation and fibronectin production in mesangial cells require caveolae. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F153-64.
- PIKE, L. J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, 44, 655-67.
- PORN, M. I. & SLOTTE, J. P. 1995. Localization of cholesterol in sphingomyelinase-treated fibroblasts. *Biochem J*, 308 ( Pt 1), 269-74.
- QUINTAS-CARDAMA, A. & VERSTOVSEK, S. 2013. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin Cancer Res*, 19, 1933-40.
- RAJU, R., PALAPETTA, S. M., SANDHYA, V. K., SAHU, A., ALIPOOR, A., BALAKRISHNAN, L., ADVANI, J., GEORGE, B., KINI, K. R., GEETHA, N. P., PRAKASH, H. S., PRASAD, T. S., CHANG, Y. J., CHEN, L., PANDEY, A. & GOWDA, H. 2014. A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. *J Signal Transduct*, 2014, 962962.
- RAVICHANDRAN, K. S. 2001. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20, 6322-30.
- ROBERT, L. & FULOP, T. 2014. Aging of cell communication: loss of receptor function. *Interdiscip Top Gerontol*, 39, 142-62.
- ROBERT, L., LABAT-ROBERT, J. & ROBERT, A. M. 2010. Receptors and aging: dedicated to the memory of Paul Ehrlich for the 100th anniversary of his Nobel Prize. *Arch Gerontol Geriatr*, 51, 260-3.
- RODIER, F. & CAMPISI, J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192, 547-56.
- ROSSI, D. J., BRYDER, D., SEITA, J., NUSSENZWEIG, A., HOEIJMAKERS, J. & WEISSMAN, I. L. 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447, 725-9.
- ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. & ANDERSON, R. G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68, 673-82.
- SAEZ, I. & VILCHEZ, D. 2014. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases. *Curr Genomics*, 15, 38-51.
- SCHEIFFELE, P., RIETVELD, A., WILK, T. & SIMONS, K. 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*, 274, 2038-44.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHNEIDER, M. R. 2014. The magnificent seven: epidermal growth factor receptor ligands. *Semin Cell Dev Biol*, 28, 1.
- SCHUCK, S. & SIMONS, K. 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci*, 117, 5955-64.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SHAW, A. S. 2006. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol*, 7, 1139-42.



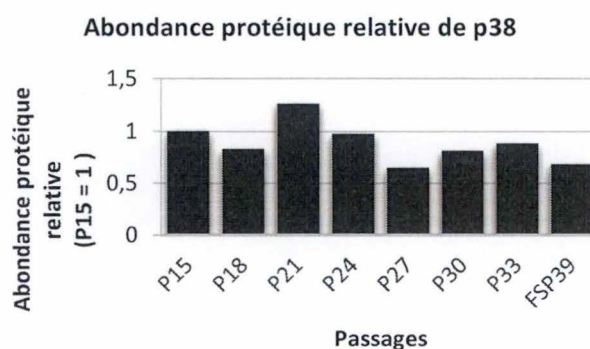
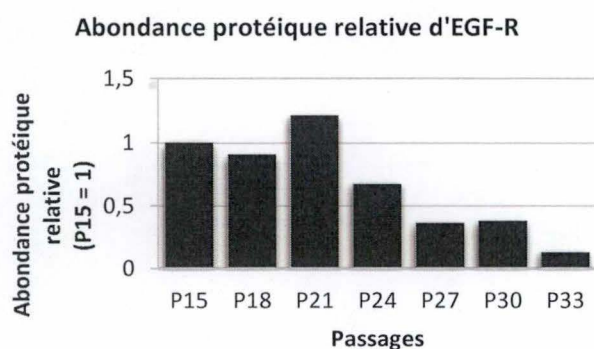
- SHIRAHARA, H., GUPTA, K., DRABIK, K. & WELLS, A. 2000. Aging fibroblasts present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors. *J Biol Chem*, 275, 19343-51.
- SIMONS, K. & GERL, M. J. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 688-99.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-72.
- SIMONS, K. & SAMPAIO, J. L. 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a004697.
- SIMONS, K. & TOOMRE, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 31-9.
- SIMPSON, R. M., WELLS, A., THOMAS, D., STEPHENS, P., STEADMAN, R. & PHILLIPS, A. 2010. Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling. *Am J Pathol*, 176, 1215-28.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-31.
- SKORSKI, T. 2002. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, 2, 351-60.
- SORKIN, A. & GOH, L. K. 2008. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*, 314, 3093-106.
- STANCU, C. & SIMA, A. 2001. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5, 378-87.
- TAN, F. C., HUTCHISON, E. R., EITAN, E. & MATTSO, M. P. 2014. Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology*.
- TIDYMAN, W. E. & RAUEN, K. A. 2009. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev*, 19, 230-6.
- TIGGES, J., KRUTMANN, J., FRITSCH, E., HAENDELER, J., SCHAAL, H., FISCHER, J. W., KALFALAH, F., REINKE, H., REIFENBERGER, G., STUHLER, K., VENTURA, N., GUNDERMANN, S., BOUKAMP, P. & BOEGE, F. 2014. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*, 138, 26-44.
- TOMAS, A., FUTTER, C. E. & EDEN, E. R. 2014. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*, 24, 26-34.
- TOUSSAINT, O., DUMONT, P., REMACLE, J., DIERICK, J. F., PASCAL, T., FRIPPIAT, C., MAGALHAES, J. P., ZDANOV, S. & CHAINIAUX, F. 2002a. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *ScientificWorldJournal*, 2, 230-47.
- TOUSSAINT, O., MEDRANO, E. E. & VON ZGLINICKI, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 35, 927-45.
- TOUSSAINT, O., REMACLE, J., DIERICK, J. F., PASCAL, T., FRIPPIAT, C., ROYER, V., MAGALHAES, J. P., ZDANOV, S. & CHAINIAUX, F. 2002b. Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence. *Biogerontology*, 3, 13-7.
- TOUSSAINT, O., ROYER, V., SALMON, M. & REMACLE, J. 2002c. Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol*, 64, 1007-9.
- TRONCOSO, R., IBARRA, C., VICENCIO, J. M., JAIMOVICH, E. & LAVANDERO, S. 2014. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 128-37.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-12.
- VELARDE, M. C., DEMARIA, M. & CAMPISI, J. 2013. Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Interdiscip Top Gerontol*, 38, 17-27.
- WAHEED, A. A. & FREED, E. O. 2009. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res*, 143, 162-76.
- WELLS, A. 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 637-43.
- YANG, J. H., LEE, H. C., LIN, K. J. & WEI, Y. H. 1994. A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Arch Dermatol Res*, 286, 386-90.
- YEAGLE, P. L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 822, 267-87.

- ZIDOVETZKI, R. & LEVITAN, I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 1311-24.
- ZOU, H., STOPPANI, E., VOLONTE, D. & GALBIATI, F. 2011. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech Ageing Dev*, 132, 533-42.
- ZOU, H., VOLONTE, D. & GALBIATI, F. 2012. Interaction of caveolin-1 with Ku70 inhibits Bax-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7, e39379.
- ZWANG, Y. & YARDEN, Y. 2006. p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J*, 25, 4195-206.
- ZWANG, Y. & YARDEN, Y. 2009. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*, 10, 349-63.

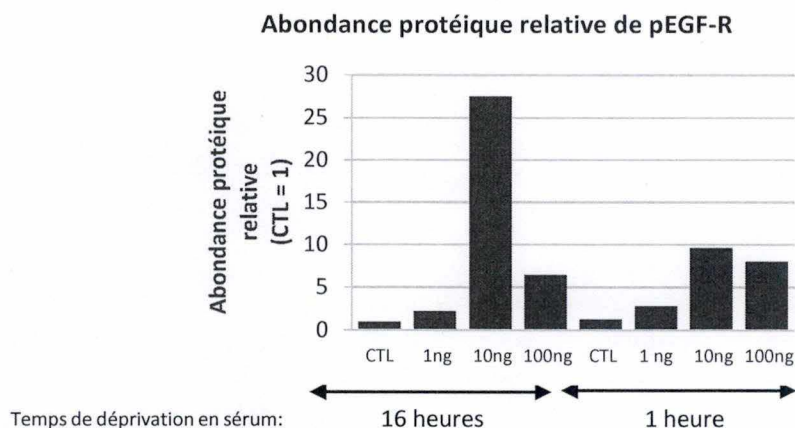




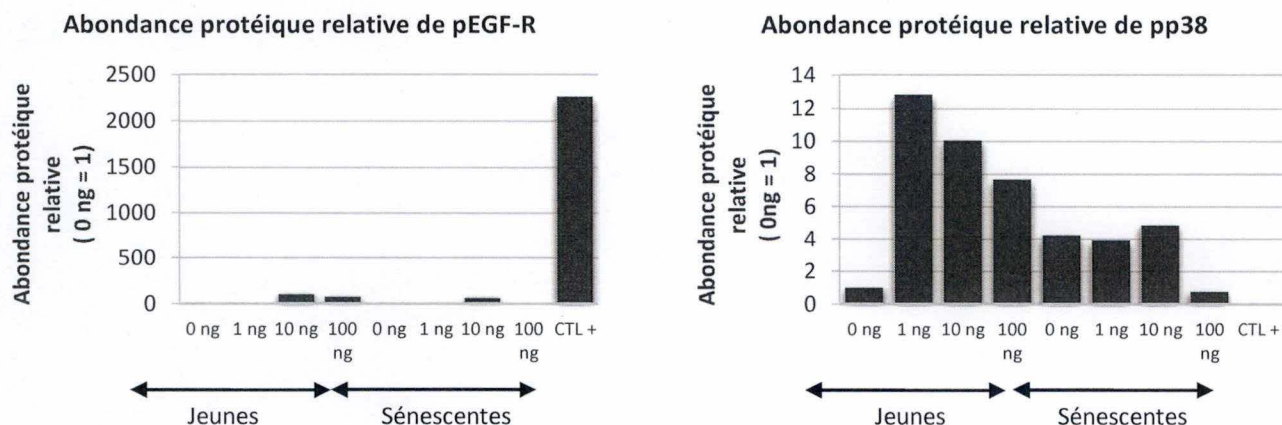
**Figure supplémentaire S1: Expression de p16<sup>INK-4A</sup> dans des fibroblastes au cours de la sénescence replicative.** Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 22 B (par rapport à CTL = P15 et rapporté à la quantification de l'alpha-tubuline).



**Figure supplémentaire S2: Expression d'EGF-R et p38 dans des fibroblastes au cours de la sénescence replicative.** Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 23 B (par rapport à CTL = P15 et rapporté à la quantification de l'alpha-tubuline).

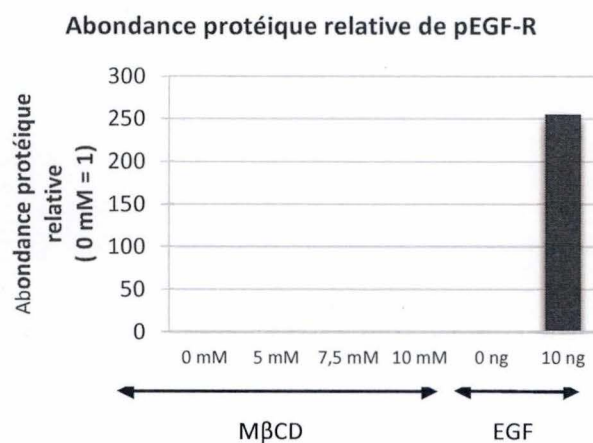


**Figure supplémentaire S3: Expression de pEGF-R (Tyr1173) dans des fibroblastes après une stimulation avec de l'EGF après 16 heures ou 1 heure de déprivation en sérum.** Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 26 (par rapport à CTL = 1 et rapporté à la quantification de RPL13a)

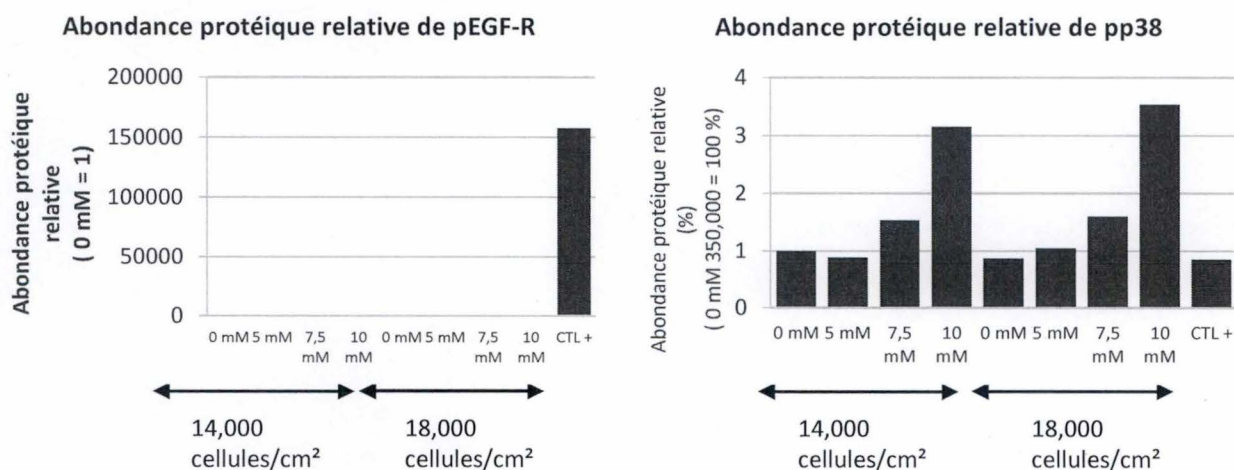


**Figure supplémentaire S4: Expression de pEGF-R (Tyr1173) dans des fibroblastes jeunes et sénescents après une stimulation avec de l'EGF après 16 heures de déprivation en sérum.** Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 27 (par rapport à 0 ng = 1 et rapporté à la quantification de l'alpha-tubuline).

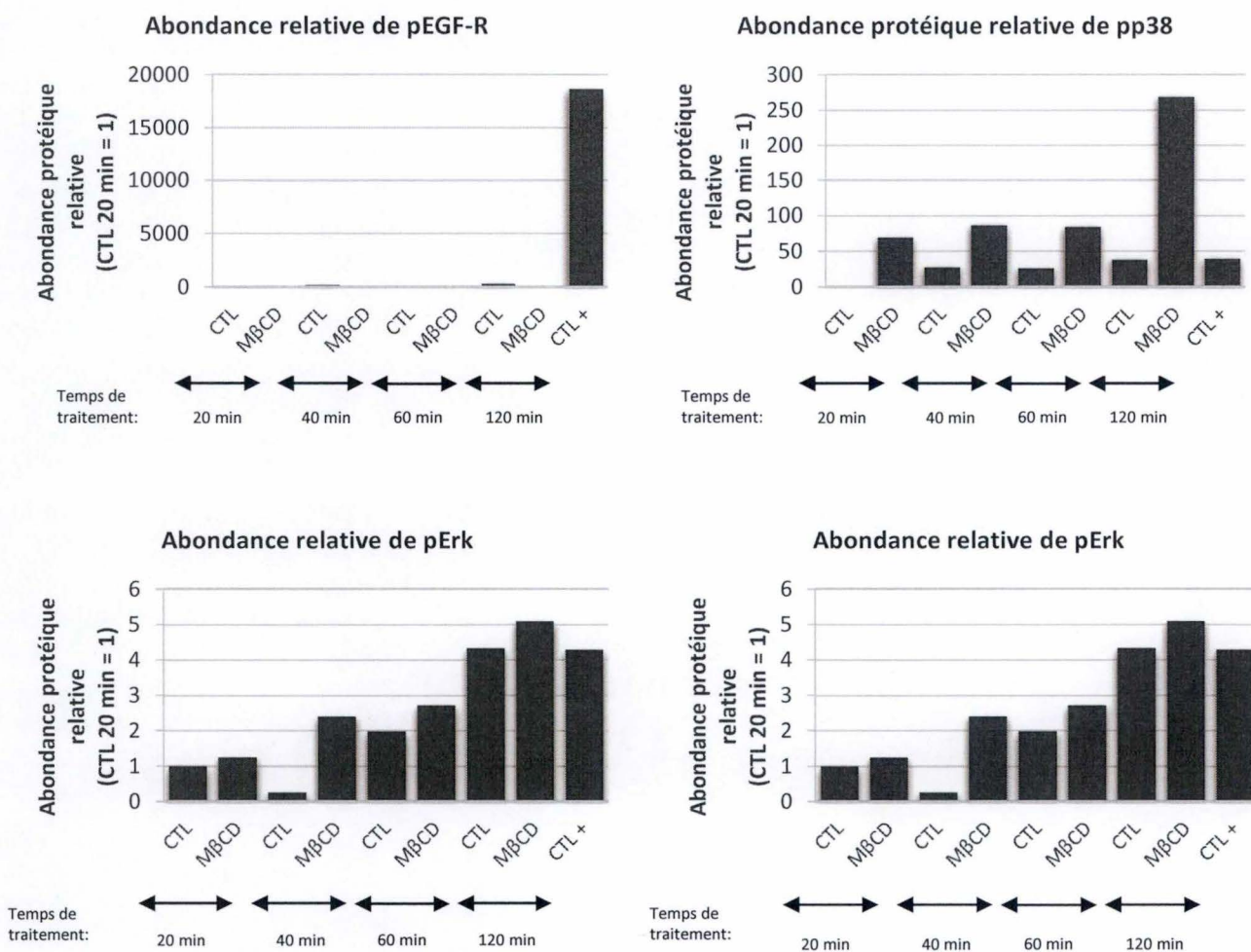




**Figure supplémentaire S5: Expression de pEGF-R (Tyr1173) dans des fibroblastes après un traitement avec la MβCD à 7,5 mM pendant 1 heure après 1 heure de déprivation en sérum. Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 36 (par rapport à 0 mM = 1 et rapporté à la quantification de RPL13a).**

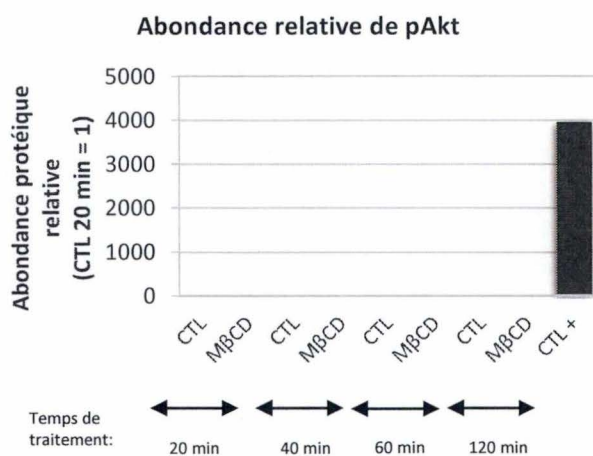
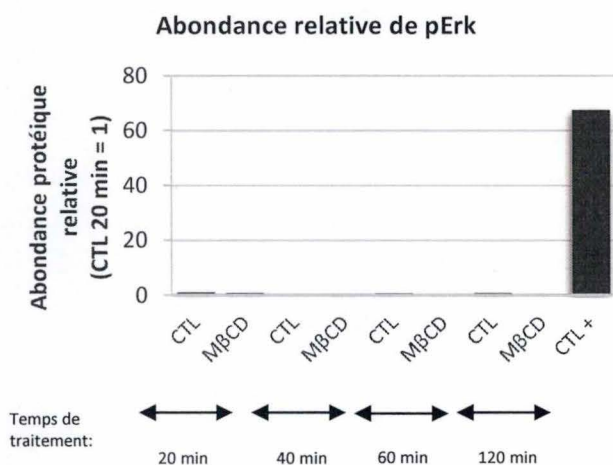
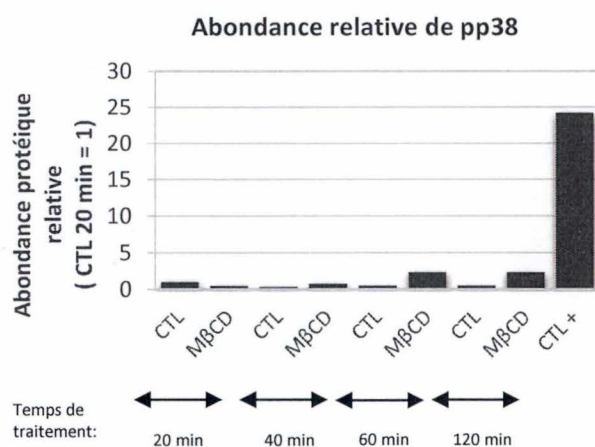
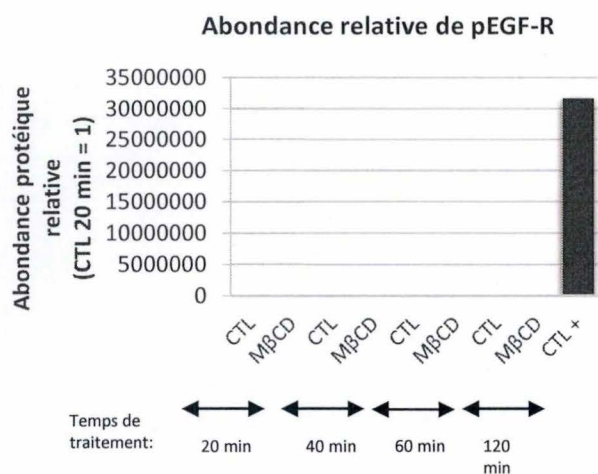


**Figure supplémentaire S6: Expression de pEGF-R (Tyr1173) et de p38 dans des fibroblastes après un traitement avec la MβCD à 7,5 mM pendant 1 heure après 16 heures de déprivation en sérum et comparaison entre deux confluences (14,000 cellules/cm² et 18,000 cellules/cm²). Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 37 (par rapport à 0 mM = 1 et rapporté à la quantification de RPL13a).**



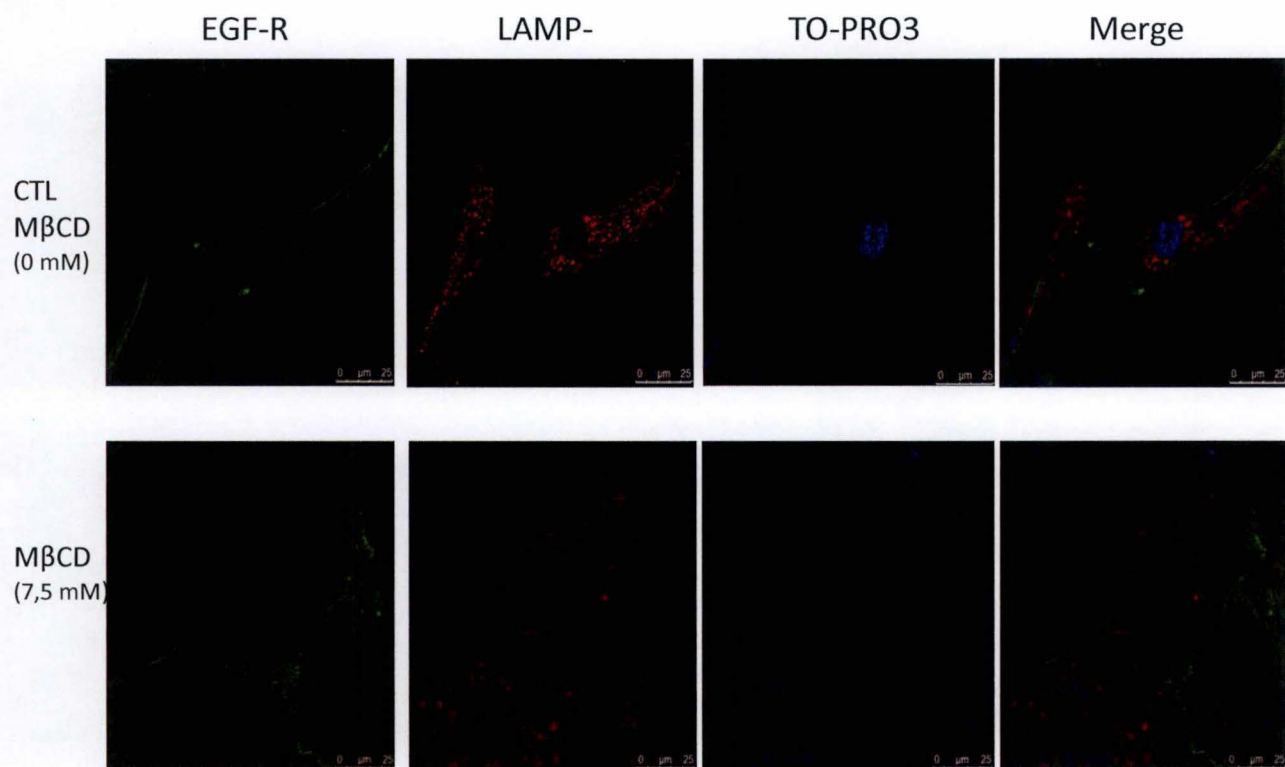
**Figure supplémentaire S7: Expression de pEGF-R (Tyr1173), pp38 (Thr180-Tyr182), pErk 44/42 et pAkt (Ser473) dans des fibroblastes jeunes après un traitement avec la MβCD à 7,5 mM pendant 20, 40, 60 ou 120 minutes après 16 heures de déprivation en sérum.** Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 38 A (par rapport à CTL 20 min = 1, rapporté à la quantification de l'alpha-tubuline).



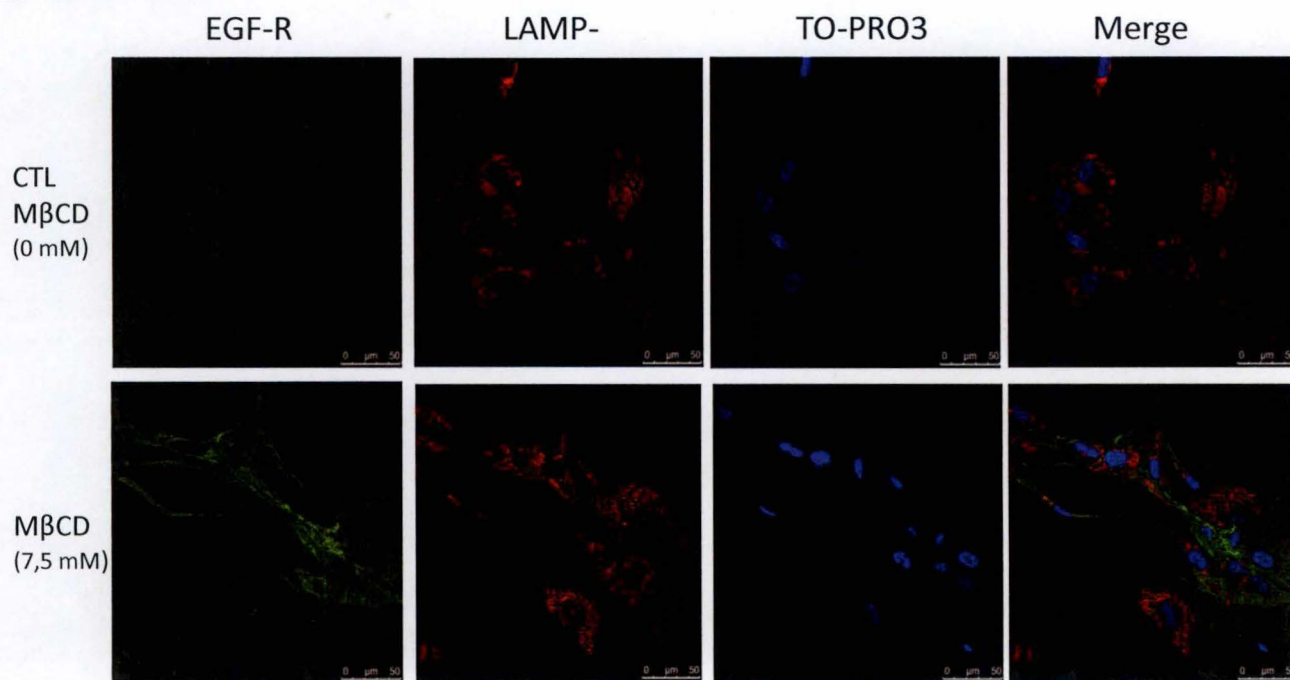


**Figure supplémentaire S8: Expression de pEGF-R (Tyr1173), pp38 (Thr180-Tyr182), pErk 44/42 et pAkt (Ser473) dans des fibroblastes sénescents après un traitement avec la MβCD à 7,5 mM pendant 20, 40, 60 ou 120 minutes après 16 heures de déprivation en sérum. Quantification des bandes obtenues par western blot présenté à la figure 38 B (par rapport à CTM 20 min= 1, rapporté à la quantification de l'alpha-tubuline).**

**A** 20 minutes:

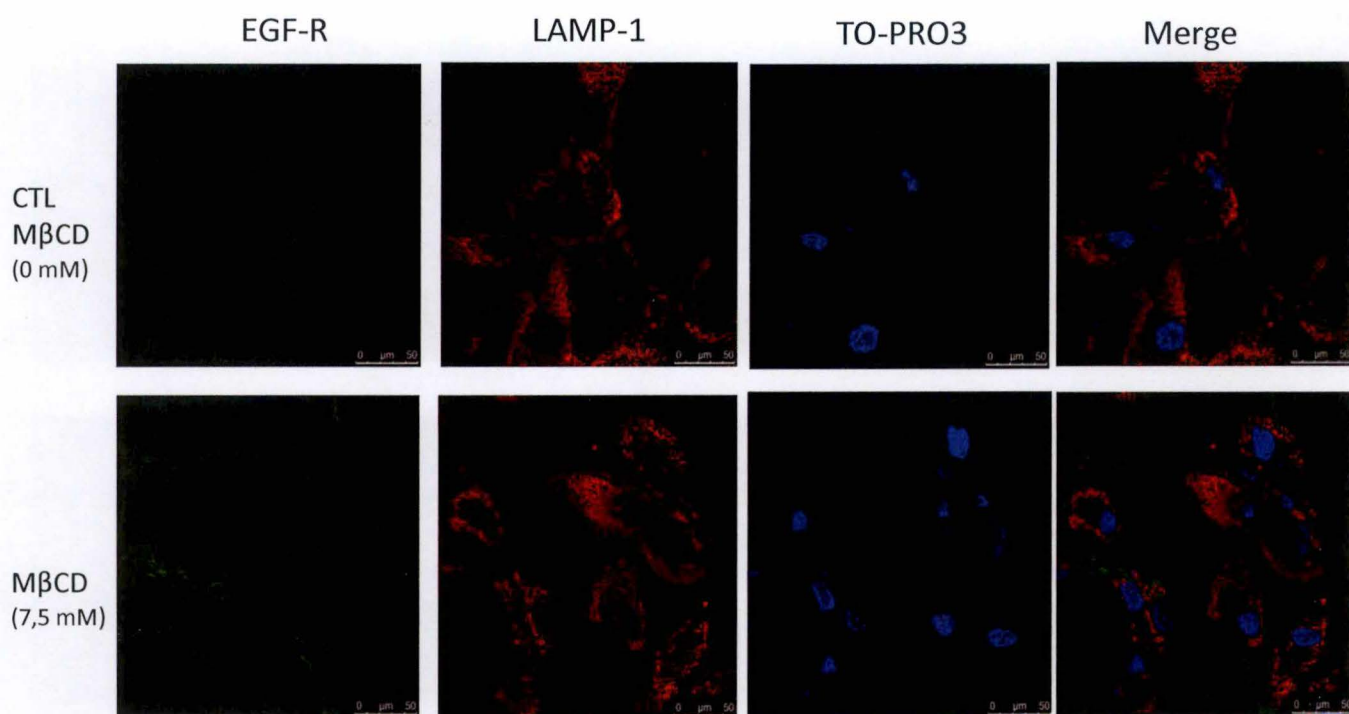


**B** 60 minutes:

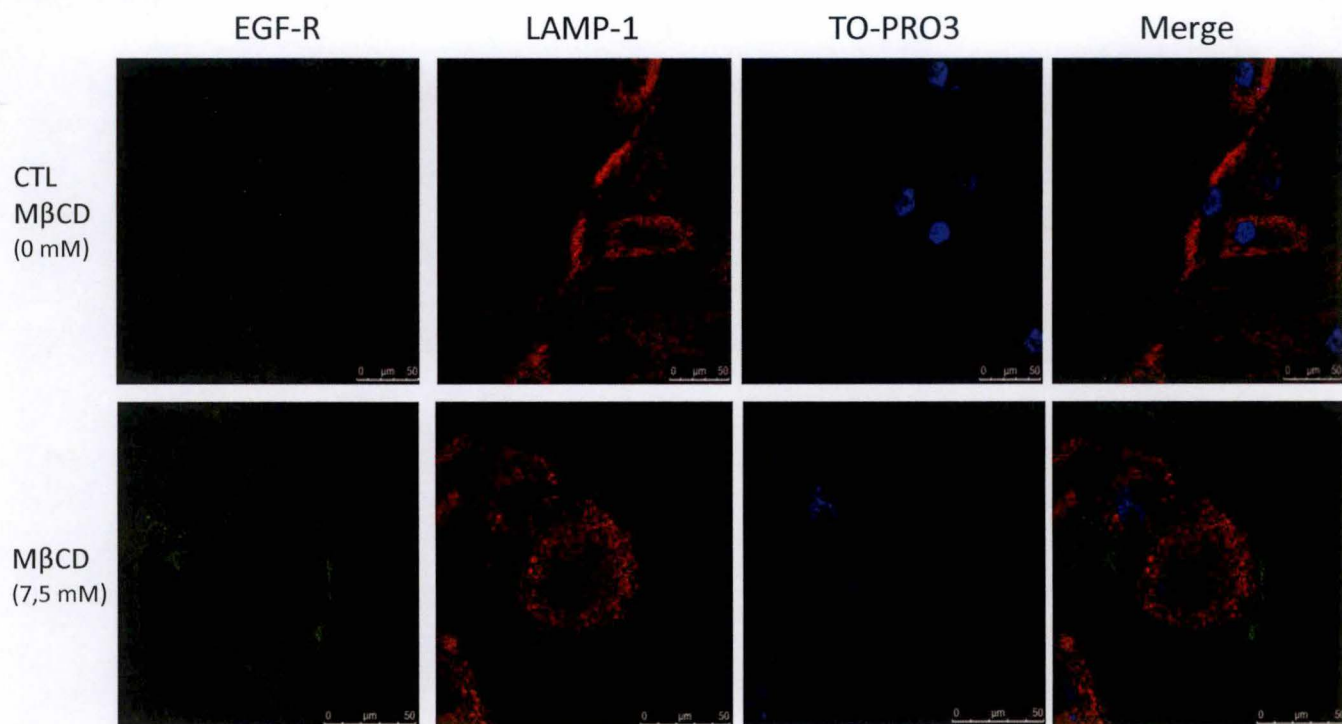




**C** 20 minutes:



**D** 60 minutes:



**Figure supplémentaire S9: Etude de colocalisation entre EGF-R et LAMP-1 par immunofluorescence chez des fibroblastes jeunes (A,B) et sénescents (C,D) stimulés avec de la M $\beta$ CD.** Les cellules ont été ensemencées sur des couvres-objets à une densité de 11,000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu BME complet. Le lendemain, elles ont été déprivées en sérum pendant 4 heures puis traitées avec de la M $\beta$ CD à 7,5 mM pendant 20 minutes (**A pour les jeunes, C pour les sénescents**) ou pendant 60 minutes (**B pour les jeunes, D pour les sénescents**). Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions sans être traitées avec de la M $\beta$ CD (0 mM). L'EGF-R et LAMP-1 ont été localisés par immunofluorescence en utilisant un anticorps reconnaissant la forme totale de EGF-R (en vert) et un anticorps reconnaissant LAMP-1 (en rouge). Les noyaux ont été colorés par le TO-PRO3 et sont visibles en bleu.